

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

Daniel Rial

**Proteína Prion Celular (PrP^C) altera a suscetibilidade ao etanol
através da modulação do sistema dopaminérgico**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia
Orientador: Prof. Dr. Rui Daniel S. Prediger

Florianópolis – SC

2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rial, Daniel
Proteína Prion Celular (PrPC) altera a suscetibilidade
ao etanol através da modulação do sistema dopaminérgico
[tese] / Daniel Rial ; orientador, Rui Daniel S. Prediger -
Florianópolis, SC, 2012.
99 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Farmacologia. 3. Álcool. 4. Prion.
I. Prediger, Rui Daniel S. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.
III. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ademar (*in memoriam*) e Marlisa por todo o suporte, emocional e financeiro;

A Tia Nita, por todo carinho, compreensão e exemplo de liderança;

Ao Professor Rui, que apesar dos altos e baixos que a vida proporciona sempre esteve confiante no meu trabalho (eu acho);

Ao Professor Rodrigo Cunha, um exemplo de cientista e ser humano, pelos questionamentos e disponibilidade, além de maior crítico deste trabalho (e do mundo);

A Professora Lisiane Porsiúncula, pela oportunidade de realizar o doutorado-sanduíche no momento certo, além dos conselhos científicos e enológicos;

Aos Professores Leandro Bertoglio e Roger Walz, pela ajuda e paciência para sanar as dúvidas e amenizar as insanidades deste aluno;

Aos demais Professores do Departamento de Farmacologia por todo apoio e puxões de orelha; em especial aos professores que participaram das bancas da minha qualificação e defesa de doutorado.

A Professora Vilma R. Martins, por gentilmente ceder os animais, os peptídeos, mas acima de tudo pela valorosa contribuição crítica ao trabalho;

Ao Professor José Eduardo da Silva Santos por ter me iniciado ao pensamento questionador científico e pelo apoio incondicional as minhas intenções acadêmicas;

Aos colegas do laboratório de Florianópolis (LEXDON): Aderbal, Sandro, Eduardo, Adalba, Nelsão, Marcelo (carecapreta), Xikota, Pablo, Rafael Mariano, Vanessa, Juliana, Pamplona, Samantha pela

amizade, companheirismo, momentos de descontração e trocas de informações;

Aos colegas e amigos de laboratório de Coimbra (Portugal), principalmente ao Henrique, Ângelo e Cristina por todo aprendizado científico ou não;

A todos os colaboradores do trabalho;

A CAPES, CNPq e FAPESC pelo apoio financeiro, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE TABELAS.....	XV
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 PRION: CONCEITO E PATOLOGIAS.....	1
1.2 PROTEÍNA PRION CELULAR (PrP ^C).....	3
1.3 COMPORTAMENTO DE ESCALADA.....	7
1.4 SISTEMA DOPAMINÉRGICO.....	8
1.5 VIA MESOCORTICOLÍMBICA E SISTEMA DOPAMINÉRGICO....	10
1.6 ADIÇÃO AO ETANOL.....	11
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 ANIMAIS.....	17
3.2 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	18
3.2.1 Comportamento de escalada.....	18
3.2.2 Atividade locomotora no campo aberto.....	18

3.2.3 Teste de aquisição da tolerância rápida.....	19
3.2.4 Teste de preferência condicionada de lugar (PCL).....	20
3.2.5 Consumo oral voluntário de etanol.....	21
3.2.6 Consumo oral voluntário de etanol (5 horas).....	22
3.3 ADMINISTRAÇÃO I.C.V. (FREE-HAND).....	22
3.4 ADMINISTRAÇÃO I.C.V. (CIRURGIA ESTEREOTÁXICA).....	23
3.5 ENSAIOS NEUROQUÍMICOS.....	23
3.5.1 Imunodeteção de proteínas.....	23
3.5.2 Análise do conteúdo de monoaminas (HPLC).....	24
3.5.3 Análise Imunocitoquímica da presença da PrP ^C no sistema dopaminérgico.....	24
3.5.4 Autorradiografia.....	27
3.5.5 Imunohistoquímica para expressão da DARPP-32 no estriado.....	27
3.5.6 Quantificação de etanol no sangue.....	27
3.6 PROCEDIMENTO DE ELETROFISIOLOGIA EXTRACELULAR CORTICO-ESTRIATAL.....	27
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1 CAMUNDONGOS NOCAUTES PARA PrP ^C APRESENTAM AUMENTO DO COMPORTAMENTO DE ESCALADA QUE É BLOQUEADO PELA ADMINISTRAÇÃO DE ANTAGONISTAS DOPAMINÉRGICOS.....	29
4.2 A DELEÇÃO GÊNICA DA PrP ^C PROMOVE ALTERAÇÕES DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO NA VIA MESOCORTICOLÍMBICA.....	30

4.3 DELEÇÃO GENÉTICA DA PrP ^C ALTERA A DENSIDADE DOS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS DO TIPO D ₁ NO ESTRIADO.....	32
4.4 EVIDÊNCIAS DA EXISTÊNCIA DA PrP ^C EM NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS.....	36
4.5 DELEÇÃO GENÉTICA OU O BLOQUEIO FARMACOLÓGICO DA PrP ^C ALTERA O PADRÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA INDUZIDA PELO ETANOL.....	38
4.6 DELEÇÃO DA PrP ^C INTERFERE NO DESENVOLVIMENTO DA TOLERÂNCIA RÁPIDA E AUMENTA A SUSCETIBILIDADE AOS EFEITOS REFORÇADORES DO ETANOL.....	43
4.7 DELEÇÃO GÊNICA E BLOQUEIO FARMACOLÓGICO DA PrP ^C REDUZEM O CONSUMO DE ETANOL.....	45
4.8 CAMUNDONGOS NOCAUTES PARA PrP ^C EXIBEM PLASTICIDADE DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO REDUZIDA APÓS ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE ETANOL.....	47
4.9 BLOQUEIO DA PrP ^C AUMENTA A SENSIBILIDADE DE SINAPSES CORTICO-ESTRIATAIS À ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE ETANOL.....	49
5. DISCUSSÃO.....	53
6. CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS.....	58
APÊNDICE.....	74

LISTA DE ABREVIações

5-HT	Serotonina
aCSF	Líquido cefalo-raquidiano artificial
AccCore	Núcleo acumbens core
AccShell	Núcleo acumbens shell
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
ATV	Área tegmentar ventral
BO	Bulbo olfatório
COF	Córtex Órbitofrontal
CPF	Córtex Pré-Frontal
CPu	Caudado Putamen
CPuDM	Caudado Putamen dorso medial
CPuDL	Caudado Putamen dorso lateral
CPuVM	Caudado Putamen ventro medial
CPuVL	Caudado Putamen ventro lateral
DA	Dopamina
DARPP-32	Fosfoproteína regulada por dopamina e AMP cíclico de 32 kDa
DAT	Transportador de dopamina
DCJ	Doença de Creutzfeld-Jakob

DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EET	Encefalites espongiformes transmissíveis
EST	Estriado
ETOH	Etanol
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GSS	Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker
HFS	Estimulação de alta frequência
HIP	Hipocampo
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
kDa	KiloDalton
LN	Laminina
LTP	Potenciação de longa duração
MAPK	Proteína Cinase Ativada por Mitógeno
mM	Milimolar
NA	Noradrenalina
Neo	Neomicina
NMDA	N-metil-D-aspartato
PCL	Preferência condicionada de lugar
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase

PKA	Proteína Cinase dependente de AMP cíclico
<i>PRNP</i>	Gene que codifica a proteína prion celular em humanos
<i>Prnp</i>	Gene que codifica a proteína prion celular em camundongos
PrP^C	Proteína Prion Celular
PrP^{Sc}	Proteína Prion infectante
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
STI1	Proteína induzida pelo estresse 1
TH	Tirosina hidroxilase
Tu	Tubérculo olfatório

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Hipótese de formação da PrP ^{Sc}	3
Figura 2 -	Observação do comportamento de escalada nas gaiolas moradias dos animais Prnp ^{0/0} e Prnp ^{+/+}	7
Figura 3 -	Gaiolas utilizadas para mensuração do comportamento de escalada.....	18
Figura 4 -	Aparato do campo aberto e uso do software Any-Maze®.....	19
Figura 5 -	Aparato do teste do Rotarod.....	20
Figura 6 -	Caixas utilizadas para a PCL.....	21
Figura 7 -	Gaiolas com as garrafas utilizadas no teste de consumo oral voluntário.....	22
Figura 8 -	Representação das subregiões do estriado utilizadas para o teste de autorradiografia.....	26
Figura 9 -	Sistema de eletrofisiologia extracelular.....	28
Figura 10 -	Caracterização do comportamento de escalada.....	30
Figura 11 -	Avaliação da expressão de TH e níveis de dopamina em camundongos Prnp ^{+/+} e Prnp ^{0/0}	31
Figura 12 -	Avaliação da densidade de receptores D ₁ em subregiões estriatais de camundongos Prnp ^{+/+} e Prnp ^{0/0}	33
Figura 13 -	Avaliação da densidade de receptores D ₂ em subregiões estriatais de camundongos Prnp ^{+/+} e Prnp ^{0/0}	34

Figura 14 -	Avaliação da densidade de transportadores de dopamina (DAT) em subregiões estriatais de camundongos Prnp ^{+/+} e Prnp ^{0/0}	35
Figura 15-	Avaliação da expressão de DARPP-32 em fatias estriatais de camundongos Prnp ^{+/+} e Prnp ^{0/0}	36
Figura 16 -	Avaliação da co-localização da PrP ^C com o sistema dopaminérgico.....	38
Figura 17 -	Avaliação da resposta locomotora ao etanol em camundongos Prnp ^{+/+} e Prnp ^{0/0}	39
Figura 18	-Avaliação de possíveis lesões hepáticas após o tratamento consecutivo com etanol em camundongos Prnp ^{+/+} e Prnp ^{0/0}	42
Figura 19-	Avaliação dos efeitos do etanol sobre a atividade locomotora de camundongos C57Bl/6 pré-tratados com o anticorpo anti-prion (α -GST PrP ^C)......	43
Figura 20-	Avaliação da aquisição de tolerância rápida em camundongos Prnp ^{+/+} e Prnp ^{0/0}	44
Figura 21-	Avaliação do aspecto reforçador induzido pelo etanol utilizando o protocolo de PCL.....	45
Figura 22-	Avaliação do consumo de etanol em camundongos com deleção gênica ou bloqueio farmacológico da PrP ^C	47

Figura 23-	Avaliação da densidade de receptores dopaminérgicos do tipo D ₁ em subregiões estriatais de camundongos Prnp ^{+/+} e Prnp ^{0/0} tratados repetidamente com salina ou etanol.....	49
Figura 24-	Avaliação dos efeitos do etanol na transmissão sináptica basal e LTP em fatias cortico-estriatais de camundongos C57Bl/6.....	50
Figura 25-	Avaliação dos efeitos do anticorpo anti-prion (α -GST PrP ^C) na transmissão sináptica basal e LTP em fatias cortico-estriatais de camundongos C57Bl/6.....	51
Figura 26-	Avaliação do efeito sinérgico entre o etanol e o anticorpo anti-prion (α -GST PrP ^C) na transmissão sináptica basal e LTP em fatias cortico-estriatais de camundongos C57Bl/6.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Níveis de Serotonina e Noradrenalina em diferentes regiões cerebrais de camundongos Prnp ^{+/+} e Prnp ^{0/0} ..	32
Tabela 2 -	Massa corpórea dos animais tratados repetidamente com etanol submetidos ao teste de atividade locomotora do campo aberto.....	40
Tabela 3 -	Concentração de etanol no sangue dos animais tratados consecutivamente com etanol submetidos ao teste de atividade locomotora do campo aberto.....	41
Tabela 4 -	Conteúdo de DA, Serotonina e Noradrenalina em diferentes regiões cerebrais de camundongos Prnp ^{+/+} e Prnp ^{0/0} tratados repetidamente com salina ou etanol.....	48

Resumo

O consumo de drogas com potencial aditivo, como o etanol, induz alterações sinápticas profundas na via mesocorticolímbica, que estão associadas com as alterações comportamentais observadas em indivíduos adictos. Desta maneira, a investigação de sistemas capazes de modular a neurotransmissão dopaminérgica pode revelar novos alvos, com intuito de interferir no processo de adição às drogas. Neste trabalho, demonstramos de maneira inédita a interação entre a proteína prion celular (PrP^C) e o sistema dopaminérgico e que esta interação é capaz de modular diversas propriedades aditivas do etanol. Demonstramos a presença da PrP^C em neurônios dopaminérgicos e a importância desta proteína na modulação dos níveis de dopamina em diferentes áreas cerebrais, na expressão de receptores dopaminérgicos e do seu mecanismo efetor mais importante, a DARPP-32. A deleção genética ou o bloqueio farmacológico da PrP^C também alteraram processos seminais para o desenvolvimento da adição ao etanol, como o desenvolvimento da tolerância rápida, o consumo oral voluntário, e comportamentos motivacionais, assim como propriedades de transmissão basal e de plasticidade utilizando eletrofisiologia extracelular cortico-estriatal. Em conjunto, nossos dados indicam que a PrP^C tem um papel fundamental sobre a homeostasia da neurotransmissão dopaminérgica e que a interação PrP^C/dopamina modula as propriedades aditivas ao etanol em camundongos.

Palavras-chaves: Proteína prion celular (PrP^C), dopamina, etanol, adição, comportamento.

Abstract

Chronic consumption of drugs with addictive potential, such as ethanol, induces profound synaptic changes in the dopaminergic mesocorticolimbic pathway that underlies the long-term behavioral alterations seen in addicted subjects. Thus, exploring modulatory systems found in dopaminergic neurons may reveal novel targets to interfere with drug addiction. Here we report that interactions between cellular prion protein (PrP^C) and dopamine modulate ethanol addictive properties in mice. PrP^C was found in dopaminergic neurons and the genetic deletion of this protein downregulated striatal dopamine D₁ receptors and its main intracellular effector DARPP-32 and reduced dopamine levels in the prefrontal cortex. Genetic or pharmacological blockage of PrP^C also altered the development of rapid tolerance, self-administration and drug seeking behavior to ethanol in mice, as well as ethanol properties in extracellular cortico-striatal electrophysiology. Altogether, our data indicate that PrP^C plays a pivotal role on dopaminergic neurotransmission homeostasis and that PrP^C-dopamine interactions modulate ethanol addictive properties in mice.

Keywords: cellular prion protein (PrP^C), dopamine, ethanol, addiction, behavior.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Prion: Conceito e Patologias

O termo príon, provindo de “**PR**oteinaceous **I**nfectious **O**rga**N**isms”, foi inicialmente sugerido pelo Dr. Stanley Prusiner (na época pesquisador da Universidade da Califórnia) (Prusiner, 1982a), que, além de ter proposto o termo, também foi um dos principais cientistas a formar o conceito por trás dos prions. Este conceito propriamente dito foi baseado em muitos estudos anteriores, principalmente pela investigação acerca de algumas patologias sem agente etiológico definido.

A *scrapie* é uma doença que acomete ovelhas, e inicialmente imaginava-se que fosse uma doença muscular causada por parasitas (Wilson, Anderson *et al.*, 1950). A transmissibilidade do agente etiológico da *scrapie* foi demonstrada, passando a ser definido como um vírus de ação lenta (do inglês “*slow-virus*” termo cunhado por Bjorn Sigurdsson em 1958) (Sigurdsson e Palsson, 1958). Os achados posteriores feitos pelo grupo liderado por Tikvah Alper (Alper, Haig *et al.*, 1966; Alper, Cramp *et al.*, 1967; Alper, 1972) demonstraram que a infectividade deste mesmo agente etiológico seria resistente à inativação por ultravioleta e irradiação ionizante, resultaram em uma miríade de hipóteses sobre a natureza química do agente da *scrapie*, e nisto inclui-se a suposição clarividente de Griffith (Griffith, 1967), que sugeriu ser uma proteína auto-replicante. A partir deste ponto, o desenvolvimento do conceito e da solução do agente etiológico foi barrado por limitações técnicas da época. Entretanto, os avanços feitos pelo grupo liderado por Prusiner não cessaram e começaram a rumar para a hipótese de que o agente etiológico da *scrapie* seria uma proteína infectante sem qualquer material genético (Prusiner, Garfin *et al.*, 1980; Prusiner, Mckinley *et al.*, 1981; Prusiner, 1982b; a; Prusiner, Bolton *et al.*, 1982; Prusiner e Dearmond, 1991).

Assim como no caso da *scrapie*, o avanço no conceito do prion dependeu do estudo de outra patologia, a “*kuru*”. Descrita inicialmente por Gajdusek (Gajdusek, 1977), a *kuru* assolava a população aborígine da Papua Nova-Guiné, e era manifestada pela perda total de equilíbrio e morte do paciente. Foi então identificado o hábito daquela população, de em um ritual canibalista, ingerir as vísceras dos mortos. Em um experimento pioneiro, a injeção de tecido cerebral de pacientes mortos, integrantes desta tribo aborígine, em cérebros de macacos, geraram nestes animais os mesmos sintomas que em humanos (Gajdusek, Gibbs *et al.*, 1967). Assim, foi definida a transmissibilidade desta patologia e posteriormente identificou-se o agente etiológico como sendo o mesmo da *scrapie*, ou seja, um prion.

Como descrito acima, o conceito de prion, proveio exclusivamente do estudo de patologias sem agente conhecido. De maneira pormenorizada, as doenças priônicas correspondem às encefalopatias espongiformes transmissíveis (EET), que podem ser de natureza infecciosa, genética ou esporádica e são caracterizadas pela neurodegeneração progressiva e agregação proteica. Entre estas doenças estão a kuru e a Doença de Creutzfeldt-Jakob (DCJ) em humanos, a *scrapie* em ovelhas e as encefalopatias espongiformes bovinas, também conhecidas como a “doença da vaca-louca”, entre outras. Estas doenças podem afetar indivíduos de todas as faixas etárias com grande variedade de sintomas motores (sinais piramidais e extrapiramidais) e não motores (mioclonia visual e alterações cognitivas), e apesar de ter prevalência relativamente baixa, as EET são ainda incuráveis e invariavelmente fatais (Aguzzi, 2006). Apesar dos diferentes tipos de EET, existe um fator determinante em comum para a patogênese de todas estas patologias, que seria a conversão de uma forma fisiológica da proteína prion [Proteína prion celular (PrP^C)] em uma forma agregada e rica em regiões beta-pregueadas, que é a forma infectante, e é denominada PrP^{Sc}. Diversos experimentos comprovam a necessidade da PrP^C como protagonista na replicação e na neurodegeneração induzida pelos prions (Bueler, Aguzzi *et al.*, 1993; Bueler, Raeber *et al.*, 1994). A prova definitiva para esta afirmação adveio do surgimento dos camundongos nocautes para PrP^C. Experimentos do grupo liderado pelo Dr. Adriano Aguzzi (da Universidade de Zurique, Suíça) demonstraram que os camundongos nocautes para PrP^C são resistentes à inoculação da forma infectante da proteína prion (PrP^{Sc}), não apresentando os sinais de patologia verificada em camundongos que expressam a isoforma celular desta proteína (Bueler, Aguzzi *et al.*, 1993). Assim, estes estudos sugeriram que unidades da isoforma infectante da proteína prion, atuariam como “formas”, convertendo unidades da PrP^C em mais unidades infectantes, formando um processo de auto-propagação exponencial (Aguzzi e Haass, 2003) (Figura 1). Esta característica exponencial de auto-propagação relaciona-se a capacidade de diminuir alguma barreira energética para formação de novas unidades infectantes, levando ao recrutamento de novas unidades de PrP^C tornando o processo auto-catalítico (Aguzzi e Calella, 2009). Apesar dos conhecimentos acima citados, o mecanismo exato, ou o gatilho para o processo de neurodegeneração mediado pelos príons permanece limitado.

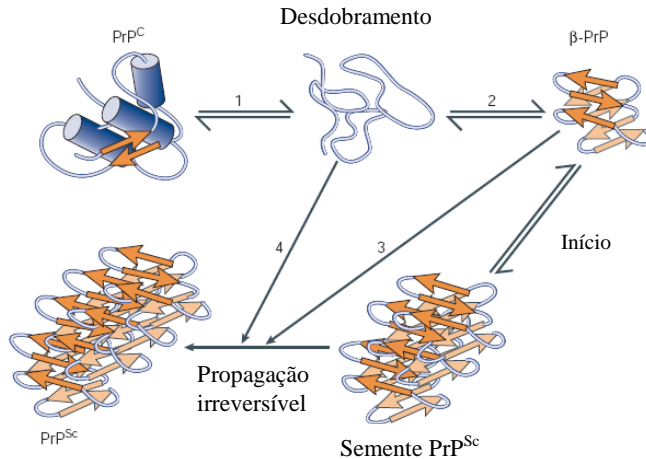


Figura 1 - Hipótese da conversão da PrP^C na sua forma infectante. Modificado de Mallucci (2005).

É digno de nota que recentemente outras doenças neurodegenerativas, como as doenças de Parkinson e de Alzheimer, têm sido investigadas por possuírem prováveis propriedades transmissíveis, por não possuírem agente etiológico definido, e por seus principais marcadores histopatológicos serem proteínas (α -sinucleína na Doença de Parkinson e tau na Doença de Alzheimer), possivelmente apresentando mecanismos do tipo prion (do inglês *prion-like mechanisms*) (Angot, Steiner *et al.*, 2010; Novak, Prcina *et al.*, 2011). Porém, as hipóteses geradas por estes estudos ainda carecem de confirmação e estudos complementares.

1.2 Proteína prion celular (PrP^C)

Através do interesse na forma infectante da proteína prion (PrP^{Sc}), estudos indicaram o gene produtor de uma isoforma desta proteína que ficou conhecida como proteína prion celular (PrP^C) (Prusiner, Groth *et al.*, 1984; Bianchin, Walz *et al.*, 2005). De forma geral, a PrP^C e a PrP^{Sc} compartilham a mesma sequência de aminoácidos e diferem somente em sua estrutura secundária, a qual confere características físico-químicas distintas para as duas isoformas (Turk, Teplow *et al.*, 1988). Enquanto a PrP^C é solúvel e suscetível a ação de proteases, a PrP^{Sc} é bastante insolúvel

e parcialmente resistente a proteólise (Meyer, McKinley *et al.*, 1986). É importante esclarecer que apesar de a PrP^C ser essencial para a instalação e evolução das encefalopatias espongiformes, esta proteína por si só não representa riscos, inclusive apresentando propriedades protetoras em diversas condições (Linden, Martins *et al.*, 2008). O gene *PRNP* que codifica a PrP^C, está localizado no braço curto do cromossomo 20 de humanos e no cromossomo 2 de camundongos e ratos (*Prnp*) (Chesebro, Race *et al.*, 1985; Oesch, Westaway *et al.*, 1985). A proteína apresenta aproximadamente 250 aminoácidos (27 kDa), com dois resíduos na região amino-terminal que apresentam glicosilação e uma âncora de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) na região carboxi-terminal (Prusiner, 1998). A PrP^C tem expressão abundante tanto no sistema nervoso central (SNC) quanto no sistema nervoso periférico (SNP), onde é encontrada no coração, fígado, tecido linfático, músculo e intestino (Prusiner, 1998). Sua expressão pode ser regulada por fatores de crescimento durante o desenvolvimento (Manson, Clarke, McBride *et al.*, 1994) e pela estrutura da cromatina (Cabral, Lee *et al.*, 2002). Quanto a localização subcelular, a PrP^C está preferencialmente localizada em domínios de membrana ricos em colesterol (*lipid rafts*) de terminais pré-sinápticos (Herms, Korte *et al.*, 2000), axônios em crescimento (Sales, Hassig *et al.*, 2002) e também no citoplasma de alguns tipos neuronais (Mironov, Latawiec *et al.*, 2003). Mais especificamente no SNC, a PrP^C é abundantemente encontrada em neurônios e glia (Prusiner, 1991). Em relação à expressão da PrP^C em sistemas de neurotransmissão, o trabalho de Ford e colaboradores indica que a PrP^C está co-expressa em todos os sistemas, à exceção do sistema dopaminérgico (Ford, Burton *et al.*, 2002).

Apesar de sua alta expressão no SNC e da importância das funções da PrP^C descritas nos últimos anos (Chiarini, Freitas *et al.*, 2002; Lopes, Hajj *et al.*, 2005; Steele, Emsley *et al.*, 2006), camundongos isentos de PrP^C não apresentam alterações comportamentais evidentes (Bueler, Fischer *et al.*, 1992). Uma explicação para este fenótipo normal é que a ablação de PrP^C poderia ser compensada por proteínas com funções redundantes (Bueler, Fischer *et al.*, 1992).

Com o avanço e aprimoramento dos estudos envolvendo os animais geneticamente modificados para PrP^C, estudos mais recentes têm evidenciado algumas alterações importantes após a deleção desta proteína como, por exemplo, déficits cognitivos, de desenvolvimento e de emocionalidade (Martins, Linden *et al.*, 2002; Spudich, Frigg *et al.*, 2005; Coitinho, Freitas *et al.*, 2006; Weise, Sandau *et al.*, 2006; Lobao-Soares, Walz *et al.*, 2007; Nazor, Seward *et al.*, 2007; Xikota, Rial *et al.*, 2008; Rial, Duarte *et al.*, 2009; Rial, Piermartiri *et al.*, 2012). Camundongos que não expressam a PrP^C exibem ainda alterações significantes na organização das fibras neurais (Colling, Khana *et al.*, 1997), sono, ritmo circadiano

(Tobler, Gaus *et al.*, 1996) e aprendizado espacial (Criado, Sanchez-Alavez *et al.*, 2005), além de proteger neurônios retinianos e hipocampus da morte celular programada (apoptose) pela interação com STII (Chiarini, Freitas *et al.*, 2002; Zanata, Lopes *et al.*, 2002).

Evidências consistentes mostraram a participação da PrP^C em patologias relacionadas ao envelhecimento, como a doença de Alzheimer (Ferrer, Blanco *et al.*, 2001; Aguzzi e Haass, 2003; Schwarze-Eicker, Keyvani *et al.*, 2005; Rial, Piermartiri *et al.*, 2012) e a doença de Parkinson (Wang, Chuang *et al.*, 2008). Aparentemente, placas senis Aβ-positivas em cérebros de pacientes com a doença de Alzheimer comumente contém depósitos de PrP^C (Schwarze-Eicker, Keyvani *et al.*, 2005), enquanto que as mesmas placas senis Aβ-positivas também têm sido identificadas em doenças priônicas como na DCJ e na síndrome de Gerstmann–Sträussler–Scheinker (GSS) (Miyazono, Kitamoto *et al.*, 1992; Hainfellner, Wanschitz *et al.*, 1998).

Uma importante propriedade da PrP^C é a sua capacidade de ligar-se a íons cobre (Cu²⁺). Animais nos quais o gene que codifica a PrP^C foi removido possuem 20 vezes menos Cu²⁺ no cérebro que animais normais, indicando uma associação fisiológica (Brown, Qin *et al.*, 1997). Além disso, células de cerebelo de animais que não expressam a PrP^C são mais sensíveis a radicais livres que células normais (Brown, Schulz-Schaeffer *et al.*, 1997). Uma vez que a ligação ao Cu²⁺ é importante para a atividade catalítica de muitas enzimas envolvidas com o estresse oxidativo, incluindo a superóxido dismutase (Brown, Wong *et al.*, 1999), foi sugerido que a PrP^C possa atuar como um depósito de íons cobre destinado à ligação a enzimas que previnem o estresse oxidativo (Brown, Qin *et al.*, 1997). Dados da literatura indicam ainda que a PrP^C possa ser um sensor de estresse celular, que desencadearia um processo de sinalização que ativa os sistemas antioxidantes e as defesas celulares (Rachidi, Vilette *et al.*, 2003).

A caracterização de ligantes celulares para a PrP^C tem proporcionado um avanço importante na determinação do seu papel biológico. Demonstrou-se previamente que o receptor de laminina de 37/67 kDa interage com a PrP^C e participa de sua internalização (Gauczynski, Peyrin *et al.*, 2001). Além disso, este mesmo receptor é requerido para a propagação da forma infectante da proteína priônica (PrP^{Sc}) em células neuronais infectadas (Leucht, Simoneau *et al.*, 2003).

A PrP^C interage ainda com o plasminogênio (Ellis, Daniels *et al.*, 2002) e com a caseína cinase (Meggio, Negro *et al.*, 2000) modulando suas atividades. Diversas moléculas da matriz extracelular também já foram descritas como ligantes de PrP^C, entre elas os glicosaminoglicanos (Gonzalez-Iglesias, Pajares *et al.*, 2002), os proteoglicanos (Keshet, Bar-Peled *et al.*, 2000), a heparina (Warner, Hundt *et al.*, 2002) e a molécula de adesão celular neural (NCAM) (Schmitt-Ulms, Legname *et al.*, 2001). Foi

descrito também o envolvimento de PrP^C no estímulo de vias de sinalização, como as que envolvem a via do fosfatidil-inositol-3 cinase (PI3K), proteína cinase dependente de AMP cíclico (PKA) e proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) (Chen, Mange *et al.*, 2003).

Outros trabalhos demonstram que a PrP^C pode ligar-se a duas outras proteínas: STI1 (*Stress Inducible Protein 1*) e a Vitronectina. A ligação entre PrP^C e STI1 é específica e de alta afinidade no sítio que compreende os aminoácidos 113-128 da molécula de PrP^C e nos resíduos 230-245 de STI1. A interação entre as duas proteínas desencadeia sinais de proteção dependentes da via de PKA em neurônios retinianos (Chiarini, Freitas *et al.*, 2002; Zanata, Lopes *et al.*, 2002), promove crescimento neurítico, além de proteger neurônios hipocampus da morte celular induzida pela estaurosporina (Lopes, Hajj *et al.*, 2005).

O sinal induzido por cada um desses ligantes pode ter um papel cooperativo em alguns eventos biológicos. Acredita-se que a PrP^C, pelo grande número de interações, tenha funções pleiotrópicas que dependem sobretudo da sua expressão celular, bem como do contexto amplo onde está inserida.

Um estudo pioneiro caracterizou as principais alterações eletrofisiológicas hipocampus decorrentes da ausência da PrP^C (Colling, Collinge *et al.*, 1996). Neste estudo, os autores descrevem de maneira elegante a necessidade da PrP^C para a manutenção da função sináptica normal. Posteriormente, a ocorrência estas modificações eletrofisiológicas foi estendida também em nível hipocampal e pormenorizadas (Maglio, Martins *et al.*, 2006; Khosravani, Zhang, Tsutsui *et al.*, 2008; Khosravani, Zhang e Zamponi, 2008). Segundo os estudos acima citados, as alterações observadas (diferença de corrente em receptores glutamatérgicos NMDA, mas não AMPA) convergem com aquelas obtidas em testes cognitivos (Criado, Sanchez-Alavez *et al.*, 2005; Rial, Duarte *et al.*, 2009; Rial, Piermartiri *et al.*, 2012). Assim, tem sido proposto que os processos dependentes de alterações estruturais duradouras (plasticidade) são também modulados pela PrP^C.

Resultados anteriores indicam ainda que os camundongos Prnp^{0/0} apresentam respostas diminuídas no teste de indução da atividade hiperlocomotora pela administração de um antagonista glutamatérgico (MK-801), sem efeitos de interação com o sistema adenosinérgico (Coitinho, Dietrich *et al.*, 2002). Neste mesmo trabalho os autores sugerem a interação da PrP^C com outros sistemas de neurotransmissão envolvidos na atividade locomotora, como o sistema dopaminérgico.

É importante para o entendimento deste trabalho e para a racionalização do assunto a seguir, mencionar que animais nocautes para a PrP^C expressam um comportamento atípico, conhecido como comportamento de escalada (Figura 1), que não é expresso pelos

camundongos controles. Embora esta característica comportamental já tenha sido observada anteriormente por outros pesquisadores, não havia sido abordada experimentalmente de maneira consistente e sistemática.

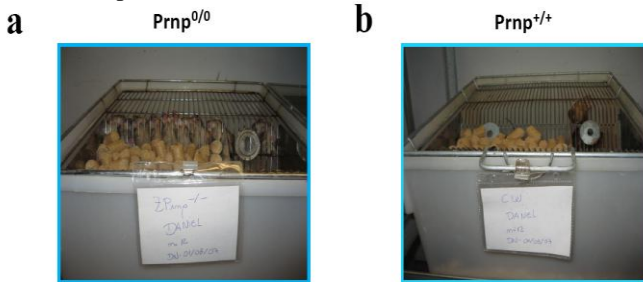


Figura 2. Observação do comportamento de escalada nas gaiolas moradias dos animais $Prnp^{0/0}$ (a) e $Prnp^{+/+}$ (b).

1.3 Comportamento de escalada

Os comportamentos estereotipados têm sido observados em diversas desordens neuropsiquiátricas, incluindo a esquizofrenia, a síndrome de Tourette e no transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (Langen, Kas *et al.*, 2010). Este tipo de comportamento é tipicamente expresso de modo contínuo e repetitivo com baixa variabilidade. O sistema dopaminérgico foi o primeiro sistema de neurotransmissão a ser associado ao comportamento repetitivo e estereotipado. Em 1874, Harnack demonstrou o comportamento de roer compulsivamente em coelhos após a injeção de apomorfina (um agonista dos receptores dopaminérgicos) este texto foi traduzido e republicado na mesma revista (Kuschinsky, 2006), observação esta reproduzida por Amsler em 1923 (Amsler, 1923). Experimentos posteriores revelaram que o comportamento de roer compulsivamente estaria associado ao núcleo estriado. É importante notar que estas descobertas antecedem qualquer conceito acerca de neurotransmissão química e até mesmo da existência de receptores. Os mecanismos pelos quais a apomorfina exerce seus efeitos foram somente desvendados na década de 1960 (Kuschinsky, 2006), e desde então a apomorfina foi classificada como um agonista dos receptores dopaminérgicos, com ações principalmente relacionadas ao estriado.

Diversas evidências sugerem que a ativação conjunta dos receptores dopaminérgicos D_1 e D_2 seja necessária para que os comportamentos estereotipados relacionados à dopamina, como o comportamento de escalada, aconteçam (Arnt, Hyttel *et al.*, 1987; Moore e

Axton, 1988; Vasse, Chagraoui *et al.*, 1988; Fetsko, Xu *et al.*, 2003). Foi previamente demonstrado que a coadministração do agonista dos receptores D_1 (SCH-23390) e do agonista dos receptores D_2 (quinpirole), mas não a administração isolada de cada um destes, é capaz de induzir o comportamento de escalada, e que a administração de um antagonista tanto dos receptores D_1 quanto dos receptores D_2 é capaz de suprimir este comportamento (Fetsko, Xu *et al.*, 2003).

Em termos neuroanatômicos, o estriado parece contribuir de maneira importante à expressão do comportamento de escalada, visto que a microinjeção de agonistas dopaminérgicos diretamente nesta área cerebral induz o comportamento, enquanto que a lesão desta estrutura suprime o comportamento, mesmo após a administração de agonistas dopaminérgicos pela via intraperitoneal (i.p.) (Protais, Costentin *et al.*, 1976; Bordi, Carr *et al.*, 1989).

Além dos estudos utilizando a manipulação farmacológica do sistema dopaminérgico, modelos genéticos tem demonstrado a integração do sistema dopaminérgico com os comportamentos repetitivos. Estes modelos incluem os camundongos nocautes para o transportador de dopamina (DAT) e para os receptores D_1 e D_3 .

No caso dos camundongos nocautes para DAT, um sistema hiperdopaminérgico se instala, gerando níveis extracelulares de dopamina até 170% maiores do que os observados nos camundongos do tipo selvagem (controles) (Berridge, 2005), induzindo forte expressão de comportamentos repetitivos. Campbell e colaboradores demonstraram que a deleção gênica dos receptores D_1 em regiões específicas do cérebro como o córtex pré-frontal (CPF) (mas não no cérebro todo) podem induzir episódios severos de estereotipia, porém estes achados ainda são questionados (Campbell, Rodefer *et al.*, 1999). Já no caso dos camundongos nocautes para receptores D_3 , respostas mais sutis se instalam (Joseph, Wang *et al.*, 2002) e inclusive as respostas à administração de anfetamina tornam-se menos severas, sendo expressas como aumento da locomoção.

Porém, como citado anteriormente, outros sistemas de neurotransmissão também parecem estar envolvidos nos comportamentos repetitivos, como os sistemas serotoninérgico, glutamatérgico e GABAérgico [para revisão ver (Langen, Kas *et al.*, 2010)]

1.4 Sistema dopaminérgico

A dopamina (DA) é uma catecolamina que foi inicialmente identificada como um precursor metabólico da noradrenalina (NA). Estudos pioneiros liderados por Arvid Carlsson no final dos anos 1950 sugeriram que a DA pudesse ter efeitos *per se*, não somente sendo um intermediário na síntese da NA (Carlsson, Lindqvist *et al.*, 1957; Carlsson e Waldeck, 1958;

Carlsson, 1959). Desde então, tem-se elucidado a influência que a DA exerce sobre comportamentos e circuitos neurais além de seus mecanismos moleculares de ação. O interesse pelas ações desta molécula foi também estimulado pelo seu envolvimento em diversas desordens neurológicas e psiquiátricas, como a doença de Parkinson, a adição às drogas, a esquizofrenia, desordens obsessivas compulsivas e síndrome de Tourette (Tritsch e Sabatini, 2012). A DA desempenha funções no controle fino de ações motoras, além de funções cognitivas como o aprendizado, memória de procedimento, atenção, tomada de decisão e aspectos de recompensa (Tritsch e Sabatini, 2012). Porém, as interpretações dos efeitos da DA às vezes são confusos devido à grande variabilidade de efeitos entre tipos celulares, dependendo da eficácia e duração da estimulação que gera em seus receptores (Braun, Laruelle *et al.*, 1997).

O sistema dopaminérgico é composto por receptores do tipo D₁ (receptores D₁ e D₅) acoplados à proteína G_s (que por consequência de sua ativação, estimulam a atividade da adenilil ciclase) e por receptores do tipo D₂ (D₂, D₃ e D₄) acoplados à proteína G_i (inibem a atividade da adenilil ciclase) (Stoof e Kebabian, 1981). Os receptores D₂ são encontrados em terminais nervosos dopaminérgicos, onde se acredita que tenham um papel autoinibitório, e pós-sinapticamente em neurônios estriatais. Receptores D₁ e D₃ também tem expressão predominante pós-sináptica em neurônios estriatais. Estudos anatômicos têm sugerido que a via estriatonigral (via direta dos gânglios basais) contém altos níveis de receptores D₁ e a via estriatopalidal (via indireta dos gânglios basais) altos níveis de receptores D₂ (Gerfen, Mcginty *et al.*, 1991). De qualquer forma, evidências bioquímicas e fisiológicas indicam que existem populações de neurônios estriatais que expressam receptores do tipo D₁ e do tipo D₂ (Surmeier, Song *et al.*, 1996; Aizman, Brismar *et al.*, 2000).

Como consequência da ativação de receptores dopaminérgicos, ocorre a regulação do estado de fosforilação de proteínas como a DARPP-32, de maneira bidirecional. A DARPP-32 (do inglês *dopamine-and cAMP-regulated phosphoprotein 32 kDa*) foi inicialmente descrita como um alvo principal da ativação dopaminérgica via receptores D₁ no estriado (Maldve, Zhang *et al.*, 2002). A fosforilação da porção treonina 34 (Thr₃₄) converte a DARPP-32 em um inibidor de proteínas fosfatases multifuncionais, tornando esta proteína um importante marcador da atividade dopaminérgica em diversos contextos, como por exemplo, o da adição às drogas (Svenningsson, Nairn *et al.*, 2005).

O sistema dopaminérgico tem um papel seminal no processo de adição às drogas, desde a modulação de processos de recompensa, do consumo de substâncias com propriedades aditivas, até nas modificações estruturais e funcionais inerentes a este processo (Koob e Weiss, 1990).

1.5 Via mesocorticolímbica e sistema dopaminérgico

Apesar das drogas de abuso frequentemente promoverem efeitos comportamentais diversos e atuarem em alvos moleculares específicos, uma característica principal é compartilhada por todas as drogas com potencial aditivo, o aumento da atividade do sistema dopaminérgico na via mesocorticolímbica (Van Vliet, Tepper *et al.*, 1996; Cami e Farre, 2003). Esta via tem sido extensamente relacionada pelo seu envolvimento em propriedades de recompensa, incluindo processos fisiológicos (como alimentação e sexo) e após o consumo de drogas com propriedades aditivas (Moonat, Starkman *et al.*, 2009).

Esta via consiste de projeções dopaminérgicas providas de corpos celulares localizados na área tegmentar ventral (ATV) para estruturas límbicas (como a amígdala, o pálido ventral, hipocampo e estriado) e áreas corticais [(como o córtex pré-frontal (CPF), córtex orbitofrontal (COF) e o cíngulo anterior)]. É interessante notar que apesar das regiões desta via constituírem um sistema integrado, algumas delas, isoladamente, possuem papéis diferentes (ou às vezes complementares) no processo de adição às drogas. Por exemplo, enquanto que o estriado e o pálido ventral, estejam aparentemente envolvidos nos processos reforçadores das drogas de abuso, a amígdala e o hipocampo apresentam grande relevância no aprendizado condicionado, também importante para o processo de adição (Volkow, Fowler *et al.*, 2003). Por outro lado, o CPF, o CFO e o cíngulo anterior, regulam as respostas emocionais, controle cognitivo e funções executivas (Volkow, Fowler *et al.*, 1993). A exposição repetida às drogas com propriedades aditivas acarretam adaptações celulares e estruturais e a integração do CPF com o estriado (EST) (utilizando neste caso uma via glutamatérgica) parece ser responsável pela diminuição do controle cognitivo além de ser componente importante na hiper-responsividade a estímulos associados à droga (Kalivas, Volkow *et al.*, 2005).

Assim, a via dopaminérgica mesocorticolímbica está envolvida desde os processos agudos de reforço às drogas até as respostas condicionadas. Alterações nesta via medeiam a perda da inibição comportamental relacionada à busca pela droga e ao comportamento de consumo exagerado, desconsiderando os riscos. Em geral, todas as drogas de abuso produzem um aumento nos níveis extracelulares de dopamina no estriado e a liberação de dopamina para o processo de recompensa, necessário para o consumo oral voluntário, sendo este um efeito hipotetizado como inerente ao início do ciclo de adição às drogas (Koob e Bloom, 1988). Estas alterações no sistema dopaminérgico por vezes são crônicas, e as drogas de abuso parecem não somente fazer uso deste sistema de neurotransmissão importante para funções de sobrevivência (Altman, Everitt *et al.*, 1996), mas também consolidam as respostas à estímulos

associados ao uso de drogas (Berke e Hyman, 2000), induzindo assim, o uso repetido da substância com propriedade aditiva.

Entre as evidências que suportam a participação do sistema dopaminérgico da via mesocorticolímbica nos efeitos reforçadores das drogas de abuso, está o fato de que lesões no estriado, ATV e pálido ventral diminuem o consumo de etanol, heroína e cocaína em roedores (Roberts, Koob *et al.*, 1980; Roberts e Koob, 1982; Hubner e Koob, 1990). Além disso, os níveis extracelulares de dopamina no estriado aumentam durante o consumo voluntário de cocaína em animais de laboratório (Weiss, Hurd *et al.*, 1992; Meil, Roll *et al.*, 1995; Wise, Newton *et al.*, 1995), enquanto que a administração sistêmica de inibidores da síntese de dopamina (Pickens e Harris, 1968; Wilson, 1974) e de antagonistas dos receptores dopaminérgicos do tipo D₁ e D₂ diminuem o consumo voluntário de uma variedade grande de drogas, incluindo cocaína, anfetaminas, opiáceos e etanol (Yokel e Wise, 1975; Woolverton, 1986; Rassnick, Pulvirenti *et al.*, 1992).

1.6 Adição ao etanol

O termo adição começou a ser utilizado no DSM-IV (1994) (4ª. Edição do Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais, do inglês “*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*”) preferencialmente ao termo dependência para evitar confusão com o termo dependência física. Dependência física se refere às adaptações que levam a sintomas de abstinência na interrupção abrupta do uso de uma droga, que recebe atualmente a denominação de síndrome de abstinência. Essas adaptações são diferentes das adaptações que ocorrem na adição, na qual a principal característica é a perda de controle sobre o uso da droga, mesmo sob consequências adversas ao indivíduo (Volkow, 2005).

Dentre os critérios utilizados para caracterizar a adição às drogas (segundo o DSM-IV) estão:

1. *Um desejo forte ou compulsivo para consumir a substância;*
2. *Dificuldades para controlar o comportamento de consumo da substância em termos de início, fim ou níveis de consumo;*
3. *Estado de abstinência fisiológica quando o consumo é suspenso ou reduzido, evidenciado por surgimento de síndrome de abstinência característica, ou o consumo da mesma substância (ou outra muito parecida) com a intenção de aliviar ou evitar sintomas de abstinência;*
4. *Evidência de tolerância, definida como a necessidade de doses crescentes da substância psicoativa para se obter os efeitos anteriormente produzidos com doses inferiores;*
5. *Abandono progressivo de outros prazeres ou interesses devido ao consumo de substâncias psicoativas;*

6. *Aumento do tempo empregado em conseguir ou consumir a substância ou recuperar-se de seus efeitos;*

7. *Persistência no consumo de substâncias apesar de provas evidentes de conseqüências manifestamente prejudiciais, tais como lesões hepáticas causadas por consumo excessivo de álcool, humor deprimido conseqüente a um grande consumo de substâncias, ou perturbação das funções cognitivas relacionadas com o uso da substância. Devem ser feitos esforços para determinar se o consumidor estava realmente, ou poderia estar consciente da natureza do dano.*

A presença de três ou mais sintomas decorrentes do uso continuado de uma substância psicoativa durante o período de um ano ou mais é necessária para caracterizar a adição, também segundo o DSM-IV.

A progressão do uso inicial para a adição propriamente dita é influenciada por muitos fatores. Entre eles a droga em si, a personalidade do usuário, e influências de outras pessoas e ambientes (Cami e Farre, 2003). A interação entre esses fatores é complexa e determina porque alguns indivíduos apresentam comportamentos aditivos e outros não. O uso inicial da droga pode ser voluntário, na busca de prazer, das suas propriedades reforçadoras, ou o alívio de dores ou sentimentos negativos, mas para a pessoa que apresenta adição, a escolha pelo uso da droga não é mais voluntária. Ocorre uma neuroadaptação semelhante ao que ocorre no aprendizado de uma tarefa e o indivíduo procura a droga mesmo com a consciência das consequências pessoais negativas e graves (Kapadia, Cook *et al.*, 2005). No entanto, os mecanismos neurobiológicos que determinam essa transição do uso controlado para o descontrolado ainda não estão totalmente esclarecidos. As recaídas no abuso das drogas é o fator clínico mais difícil de ser controlado no tratamento da adição. Após longo período de abstinência, o desejo compulsivo pela droga ou a recaída pode ser iniciado pela presença da droga em si ou por pistas ambientais que estejam associadas a ela (Moonat, Starkman *et al.*, 2009).

Epidemiologicamente o etanol é a droga com propriedade aditiva mais prevalente. Mundialmente, cerca de 2,5 bilhões de pessoas consomem algum tipo de bebida alcoólica e mais de 92 milhões de pessoas apresentam problemas relacionados ao uso desta droga (WHO, 2011). Esta alta prevalência no abuso de etanol gera uma perda financeira estimada em quase 200 bilhões de dólares anuais somente nos EUA (WHO, 2011), devido aos custos com tratamentos e prejuízos empregatícios. No Brasil, segundo o atual levantamento domiciliar sobre o uso de drogas, 11,9% das pessoas que vivem nas 107 maiores cidades do país apresentam dependência do etanol (Laranjeira, 2007). Ainda, estima-se que os problemas de saúde relacionados ao uso de etanol são responsáveis por mais de 10% dos problemas totais de saúde (Laranjeira, 2007). Além disso, o consumo de etanol está relacionado com 50% dos casos de morte em

acidentes automobilísticos, 50% dos homicídios e 25% dos suicídios (Laranjeira, 2007).

A adição ao etanol é um transtorno clinicamente heterogêneo de herdabilidade moderada a alta, e sugere-se ser dependente da interação entre genes e ambiente (Busto, 2000). Esta influência epigenética com certeza contribui para a alta variabilidade de sucesso terapêutico para a adição de drogas (aproximadamente 20%) utilizando-se as terapias farmacológicas atualmente disponíveis (Busto, 2000).

O consumo agudo e crônico de etanol interfere diferentemente com os processos de transmissão no SNC, afetando muitos, se não todos, os sistemas de neurotransmissão conhecidos (Nevo e Hamon, 1995). Os efeitos do etanol sobre seus alvos primários (sistemas GABAérgico e glutamatérgico) e a sua interferência sobre o sistema dopaminérgico são explanados a seguir.

O ácido gama-aminobutírico (GABA) medeia a neurotransmissão na maioria das sinapses inibitórias rápidas via ativação dos receptores GABA_A. Esses receptores ionotrópicos são permeáveis a ânions, principalmente ao cloreto, é formado por diversas combinações de subunidades e possuem vários sítios para modulação alostérica (Meldrum, 1987). O sítio alostérico mais conhecido é o sítio de ligação dos benzodiazepínicos, porém outras drogas como os anestésicos gerais, neuroesteróides e o etanol também modulam a atividade do receptor alostericamente. A transmissão GABAérgica é um alvo para os efeitos agudos e crônicos do etanol (Meldrum, 1982). Agudamente, o etanol produz aumento da atividade dos receptores GABA_A, esse aumento varia de acordo com a combinação de subunidades que constituem o receptor. Agudamente, o etanol também aumenta a liberação de GABA em muitas sinapses (Mizuno, Kurokawa *et al.*, 2012). A potencialização da transmissão GABAérgica parece contribuir para vários dos aspectos da intoxicação aguda por etanol, incluindo incoordenação motora, efeitos ansiolíticos e sedação (Mishra e Chergui; 2011). O sistema GABAérgico passa também por modificações decorrentes da exposição crônica ao etanol. Algumas dessas adaptações parecem ocorrer no sentido de diminuir a potencialização do sistema observada na exposição aguda ao etanol (Fleming, Acheson *et al.*; 2011). A mudança crônica mais bem caracterizada é a alteração nas subunidades que compõem o receptor GABA_A (Meldrum, 1982). Ocorre também aumento ou diminuição da quantidade de GABA liberada dependendo da região cerebral (Croucher, Meldrum *et al.*, 1983). O efeito predominante dessas adaptações à presença crônica do etanol é fazer o encéfalo se tornar hiperexcitável na ausência do etanol, o que pode levar a ansiedade elevada e até mesmo convulsões durante a abstinência (Lovinger e Roberto; Lovinger, 1996; 2006).

O glutamato medeia a neurotransmissão na maioria das sinapses excitatórias rápidas via ativação dos receptores AMPA, kainato e NMDA. Esses receptores ionotrópicos são permeáveis a cátions, principalmente sódio e cálcio. O etanol agudamente inibe a transmissão sináptica glutamatérgica, principalmente a mediada por receptores NMDA (Weight, Lovinger *et al.*, 1991). Essa inibição do NMDA provavelmente contribui para os efeitos deletérios do etanol sobre a memória, que é dependente da atividade desses receptores (Weight, Lovinger *et al.*, 1991). A exposição crônica ao etanol aumenta o número e a atividade do receptor NMDA, o que também contribui para o estado de hiperexcitabilidade durante a abstinência, assim como para o dano neural causado pelo etanol (excitotoxicidade) (Lovinger e Roberto; Popp, Lickteig *et al.*, 1998).

Considerando o grande número de alvos para o etanol é impressionante que uma das perguntas mais relevantes à adição ao etanol, que é: como o etanol interfere nas respostas dopaminérgicas? Ainda não tenha sido respondida. Apesar do fato de interferir em muitos sistemas de transmissão e transdução, nenhum destes sistemas citados acima, apresentou efeitos claros na liberação de dopamina em níveis semelhantes àqueles observados em indivíduos que consomem o etanol em estado de adição (Melis, Diana *et al.*, 2009). Sugeriu-se que estas respostas seriam mediadas pela capacidade do etanol em ativar neurônios da ATV, causando direta liberação de dopamina no estriado. Porém, experimentos de microdiálise demonstraram que a aplicação de etanol no estriado aumenta a liberação de dopamina, enquanto que aplicações de etanol na ATV não produzem o mesmo efeito (Yim, Schallert *et al.*, 1998; Ericson, Molander *et al.*, 2003). Estudos envolvendo voltametria em fatias de estriado (Budygin, Phillips *et al.*, 2001) demonstraram efeitos do etanol na liberação de dopamina somente em altas concentrações (100-200 mM).

Outra proposta seria de que o etanol poderia aumentar a liberação de dopamina pela excitação direta de neurônios dopaminérgicos. Alguns estudos demonstraram um efeito excitatório do etanol em neurônios dopaminérgicos da ATV em concentrações de 20 a 320 mM (Brodie, Shefner *et al.*, 1990; Okamoto, Harnett *et al.*, 2006), porém estes efeitos somente são mantidos pelo bloqueio concomitante de canais de potássio (Koyama, Brodie *et al.*, 2007). De maneira alternativa, o etanol pode atuar desinibindo neurônios dopaminérgicos, mais provavelmente utilizando a transmissão GABAérgica.

Diversas classes de interneurônios estriatais podem inibir a capacidade de disparo dos neurônios daquela região (Lee, Abercrombie *et al.*, 2004) e se estes neurônios estiverem inibidos (por exemplo pela ativação GABAérgica) poderia acontecer o aumento da liberação de dopamina (Mereu, Collu *et al.*, 1985).

Outra hipótese seria de que a atividade concomitante “em rede” dos diversos sistemas de neurotransmissão poderia contribuir (mesmo que cada um com pequenas parcelas) com o aumento da liberação de dopamina em níveis aceitáveis para efeitos de recompensa (Cheer, Aragona *et al.*, 2007). De forma geral, apesar de se ter boas evidências dos níveis de dopamina liberados pela ingestão de etanol, e apesar do conhecimento sobre muitos dos alvos do etanol, os mecanismos exatos pelos quais o etanol libera a dopamina durante o consumo em níveis para obter efeitos de recompensa permanecem obscuros.

Considerando a interferência em tantos sistemas de neurotransmissão, o etanol tem como efeito uma curva euforia-disforia. Mais especificamente, a euforia produzida pelo etanol acontece em baixas concentrações, e é um dos principais motivos para seu uso social (WHO 2011). Acredita-se que estas ações euforizantes estejam envolvidas com efeitos sobre o sistema opióide endógeno e pela modulação das respostas dopaminérgicas, aumentando os disparos de neurônios da ATV (Volpicelli, Alterman *et al.*, 1992). As respostas disfóricas que se caracterizam pelos efeitos aversivos do etanol, também se relacionam com alterações no funcionamento do sistema dopaminérgico na via mesocorticolímbica. Neste caso, altas concentrações de etanol inibem o disparo de neurônios da ATV (Molleman e Little, 1995).

Recentemente, alterações de plasticidade sináptica têm sido relacionadas ao processo de adição às drogas. Os processos de plasticidade induzidos por drogas estão presentes em diversas regiões cerebrais (sabidamente a via mesocorticolímbica) e estão associadas ao reforço positivo gerado pelas drogas de abuso, sendo estes mecanismos celulares seminais para o desenvolvimento da adição (Kauer e Malenka, 2007). Muitos comportamentos associados com a adição às drogas relacionam-se com eventos chave da plasticidade sináptica. Bloqueadores dos receptores NMDA, por exemplo, que efetivamente bloqueiam a potenciação de longa duração (LTP) e a depressão de longa duração (LTD) em muitas regiões cerebrais (Malenka e Bear, 2004), também previnem muitas adaptações comportamentais associadas ao processo de reforço às drogas [(como a preferência condicionado de lugar (PCL), sensibilização comportamental e consumo oral voluntário)] (Kalivas, 1993; Schenk, Valadez *et al.*, 1993). Quando aplicados direto na ATV, bloqueadores NMDA previnem tanto a sensibilização locomotora quanto a PCL (Kalivas, 1993). Mais especificamente no caso do etanol, alterações relacionadas à plasticidade sináptica tem sido demonstrada como pré-condicionamento basal a exposição à droga ou interferindo na LTP (Adermark e Lovinger, 2006; Adermark, Clarke *et al.*, 2011). Esta abordagem inserindo aspectos da plasticidade sináptica como marcador de adição às drogas tem ganhado força e reconhecimento recentemente (Kauer e Malenka, 2007).

Considerando a observação do aumento no comportamento de escalada dos animais $\text{Prnp}^{0/0}$, sua interação com o sistema dopaminérgico, e as implicações das alterações dopaminérgicas da via mesocorticolímbica no contexto da adição às drogas, pretendemos neste trabalho investigar a interação entre todos estes fatores utilizando ferramentas farmacológicas, genéticas, comportamentais, neuroquímicas e eletrofisiológicas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a interação entre a PrP^C e o sistema dopaminérgico, sua possível implicação nos processos comportamentais, neuroquímicos e eletrofisiológicos relacionados à adição ao etanol em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a influência da PrP^C em parâmetros comportamentais (comportamento de escalada) e neuroquímicos sobre a expressão do sistema dopaminérgico (expressão de TH, concentração de neurotransmissores, densidade de receptores dopaminérgicos, co-localização, expressão de DARPP-32);
- Investigar a influência do bloqueio farmacológico ou genético da PrP^C sobre as respostas induzidas pelo etanol em testes de atividade locomotora, consumo oral voluntário, PCL e teste da tolerância rápida;
- Investigar a participação da PrP^C nas possíveis alterações nas concentrações de monoaminas e densidade de receptores dopaminérgicos D_1 e D_2 induzidas pela exposição ao etanol;
- Investigar o sinergismo entre os efeitos farmacológicos da PrP^C e os efeitos farmacológicos do etanol sobre processos de transmissão sináptica basal e de plasticidade sináptica (eletrofisiologia extracelular) na via cortico-estriatal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas, por em roedores apresentarem maior tendência de consumo de etanol em comparação aos machos (Almeida, Shoaib *et al.*, 1998; Cailhol e Mormede, 2002), nocautes para o gene *Prnp*, (designados como $Prnp^{0/0}$), gerados como descrito anteriormente (Bueler, Fischer *et al.*, 1992) e seus respectivos controles ($Prnp^{+/+}$) doados pela Dra. Vilma R. Martins (do Centro de pesquisa internacional do Hospital A.C. Camargo, São Paulo, Brasil), quando possuíam de 2-3 meses de idade. Estes animais pesavam de 20-40 g e são descendentes dos camundongos *Zrch I* (*Zurich I*), enquanto que os camundongos controle foram gerados a partir de cruzamentos dos descendentes da F₁ provindos do cruzamento de camundongos 129/Sv com camundongos C57Bl/6. O genótipo dos animais foi confirmado por testes de PCR (Reação em cadeia da polimerase) utilizando-se DNA extraído da cauda dos camundongos e comparado com primers específicos.

Complementamos o estudo do comportamento de escalada utilizando outra linhagem de camundongos geneticamente modificados conhecida como *Edinburgh*. Desta linhagem dispusemos de camundongos fêmeas, pesando de 30-40 g, nocautes para PrP^C ($EPrnp^{-/-}$), heterozigotos para produção da mesma proteína ($EPrnp^{+/-}$) e controles de mesmo *background* ($EPrnp^{+/+}$). Estes animais foram desenvolvidos por Manson e colaboradores (Manson, Clarke, Hooper *et al.*, 1994) (também doados pela Dra. Vilma R. Martins) e possuem *background* constituído do cruzamento de camundongos 129/Sv com camundongos C57/Bl10. O mesmo procedimento (PCR) para controle dos genótipos foi realizado, novamente utilizando *primers* específicos. Tanto os animais *Zrch* quanto os *Edinburgh* foram mantidos no biotério do Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, Brasil) até a idade de 3-4 meses, selecionada para este estudo.

Para os estudos envolvendo a administração intracerebroventricular (tanto *free-hand* quanto por estereotaxia) utilizamos camundongos C57Bl/6 fêmeas, de nossa própria colônia. Para os experimentos de eletrofisiologia foram utilizados camundongos C57Bl/6 fornecidos pelo Laboratório Charles River (Barcelona, Espanha). Para os experimentos de co-localização (por sinaptossomas ou cultura de células) utilizamos ratos Wistar, fêmeas, com idade aproximada de 2 meses, também fornecidos pelo Laboratório Charles River (Barcelona, Espanha). Todos os animais utilizados neste estudo foram mantidos em caixas contendo 5 animais e submetidos a um ciclo claro/escuro com intervalo de 12 h (com o período

claro iniciando às 7:00) com livre acesso a comida e água. Todos os procedimentos utilizados no presente estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de ética para o uso de animais de laboratório (CEUA/UFSC) número de protocolo PP00452.

3.2 Testes comportamentais

3.2.1 Comportamento de escalada

Os camundongos ($\text{Prnp}^{+/+}$, $\text{Prnp}^{0/0}$, $\text{EPrnp}^{+/+}$, $\text{EPrnp}^{+/-}$ e $\text{EPrnp}^{-/-}$) foram testados em uma caixa de arame (30×15×18 cm) (Figura 3) e observados por 15 minutos, durante os quais se mensurou o tempo que estes animais passaram escalando. Definiu-se o comportamento de escalada, como sendo aquele onde o animal manteve as quatro patas agarradas a uma lateral ou ao topo da caixa de arame (Fetsko, Xu *et al.*, 2003). Este comportamento é um indicativo da função dopaminérgica central e é utilizado como preditivo para a avaliação de ação de drogas anti-psicóticas (Fetsko, Xu *et al.*, 2003). Tratamos ainda os animais $\text{Prnp}^{+/+}$ e $\text{Prnp}^{0/0}$ com o antagonista dos receptores D_1 SCH-23390 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) (0.1 mg/kg) ou o antagonista dos receptores D_2 Sulpirida (RBI, Natick, MA, EUA) (80 mg/kg) que foram administrados pela via intraperitoneal (i.p.), 30 minutos antes da avaliação do comportamento de escalada.



Figura 3. Gaiolas utilizadas para mensuração do comportamento de escalada (fonte: LEXDON).

3.2.2 Teste de atividade locomotora no campo aberto

O aparato do campo aberto utilizado consistiu em uma caixa de acrílico com dimensões 50×50×50 cm, iluminada a 12 lux (Figura 4). Antes do teste todos os animais foram pesados com intuito de monitorar alterações

de massa corpórea que pudessem inabilitar o comportamento dos animais. Os animais foram então colocados no centro do campo aberto e sua atividade locomotora foi gravada por um sistema de vídeo durante 10 minutos. A distância total foi mensurada automaticamente através do software Any-maze® (Any-maze® video-tracking system, Stoelting Inc., EUA). Dez minutos antes do teste, os camundongos $\text{Prnp}^{+/+}$ e $\text{Prnp}^{0/0}$ receberam uma administração de salina ou etanol (2 g/kg, i.p.) (VETEC, RJ, Brasil) por 1, 7, 14 ou 21 dias consecutivos. Camundongos C57Bl/6 foram pré-tratados (15 minutos antes da administração de etanol) pela via intracerebroventricular (i.c.v.) com PBS ou com o anticorpo anti-prion ($\alpha\text{-GST-PrP}^{\text{C}}$) nas concentrações de 50, 150 ou 300 ng/ μl .

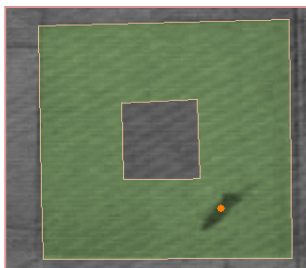


Figura 4. Aparato do campo aberto e uso do software Any-Maze® para avaliação da atividade locomotora (fonte: LEXDON).

3.2.3 Teste de aquisição da tolerância rápida.

O teste de aquisição da tolerância rápida foi realizado como descrito anteriormente (Rial, Takahashi *et al.*, 2009) utilizando o aparato do Rota-rod (Rotamex-V-EE/85) controlado por um sistema computadorizado (Columbus Instruments Computer; Columbus, OH, EUA) (Figura 5). Os camundongos foram submetidos a uma sessão de treino sob aceleração contínua (1 rpm/segundo) em até 10 tentativas de 1 minuto com 5 minutos de intervalo entre as sessões. Ao caírem da barra rotatória, os animais recebiam um leve choque nas patas (0,5 mA por 2 segundos). O tempo de queda da barra rotatória foi anotado como desempenho no treino. Os animais que não atingiram uma linha de base satisfatória (de pelo menos 20 s) nas 10 tentativas foram eliminados do teste (menos de 10% do total). Posteriormente, os camundongos $\text{Prnp}^{+/+}$ e $\text{Prnp}^{0/0}$ foram divididos em subgrupos, que receberam uma administração i.p. de etanol (1,75 g/kg) ou salina. Duas horas após a injeção de salina ou etanol, os camundongos

receberam uma dose adicional de salina ou etanol (1,0 g/kg), com intuito de obter uma dose de etanol total de 2,75 g/kg. Este procedimento de administração de etanol em duas etapas (1,75 + 1,0 g/kg) foi empregado, pois experimentos prévios demonstraram que uma única administração de 2,75 g/kg é insuficiente para gerar a aquisição da tolerância rápida (Bare, Mckinzie *et al.*, 1998). Após 24 h, todos os camundongos, inclusive os controles, receberam uma dose de etanol (1,75 g/kg, i.p.) e foram novamente submetidos ao teste do rotarod com intuito de avaliar a aquisição da tolerância rápida.



Figura 5. Aparato do teste do Rotarod (fonte: LEXDON).

3.2.4 Teste da preferência condicionada de lugar (PCL)

Os efeitos motivacionais do consumo de etanol foram avaliados utilizando-se o teste da PCL com viés (Tzschentke, 2007). A PCL foi avaliada em quatro caixas idênticas de acrílico (Figura 6) que possuem três compartimentos separados por portas removíveis. Os dois compartimentos de condicionamento (23×16×15 cm) apresentam pistas táteis e visuais distintas: um compartimento é preto com o chão liso, e o outro é preto com listras brancas e com chão gradeado. O compartimento central (neutro) (10×16×15 cm) é cinza com o chão liso e é onde se encontram as portas (5×5 cm) que dão acesso aos outros compartimentos. Este teste foi conduzido com luminosidade de 10 lux. O comportamento de cada camundongo foi gravado através de sistema de vídeo. O protocolo de PCL consistiu de oito dias, divididos em três diferentes fases: pré-condicionamento, condicionamento, e pós-condicionamento. Na fase de pré-condicionamento (dia 1), os camundongos tiveram acesso livre a todos os três compartimentos por 15 minutos. O tempo gasto pelo animal em cada compartimento foi mensurado.

A fase de condicionamento (dias 2-7) consistiu de seis sessões de 25 minutos, uma por dia. Imediatamente após a administração de etanol (0,5 ou 2,0 g/kg, i.p.), os animais foram confinados em um compartimento e, em dias alternados, receberam salina e foram confinados no compartimento oposto. O grupo controle recebeu salina antes do condicionamento em cada compartimento. Na fase de pós-condicionamento (dia 8), cada animal foi colocado no compartimento central (neutro) e teve livre acesso aos três compartimentos. O tempo gasto em cada compartimento foi mensurado pelo período de 15 minutos.

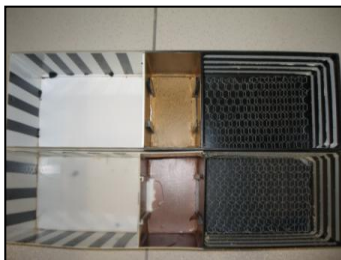


Figura 6. Caixas utilizadas para a avaliação da PCL ao etanol (fonte: LEXDON).

3.2.5 Consumo oral voluntário de etanol

Todos os camundongos tiveram acesso por 24 horas a duas garrafas idênticas (Figura 7). Uma garrafa continha água e a outra concentrações crescentes de etanol (3%, 6%, 10% e 20%, v/v em água). Os camundongos foram expostos a cada concentração de etanol por cinco dias de acordo com o procedimento descrito anteriormente (Savelieva, Caudle *et al.*, 2002). A posição das duas garrafas foi trocada diariamente durante o período de teste com o intuito de prevenir um viés de posição das garrafas. As garrafas foram pesadas diariamente e os valores de consumo expressos como gramas de etanol por quilogramas de peso corporal pelo consumo absoluto durante o período de teste.



Figura 7. Gaiolas com as garrafas utilizadas no teste de consumo oral voluntário de etanol (fonte: LEXDON).

3.2.6 Consumo oral voluntário de etanol (Protocolo de 5 horas)

Os camundongos foram expostos a um protocolo com acesso a uma garrafa contendo água e outra contendo solução de etanol 10% (v/v). O consumo de líquidos foi monitorado durante um período de teste de cinco horas por dia, durante 5 dias, como descrito previamente (El-Ghundi, George *et al.*, 1998). Este protocolo foi utilizado baseado na cinética de ação do anticorpo anti-prion (Martins, Graner *et al.*, 1997). Assim podemos certificar que pelo período de teste o anticorpo estaria promovendo suas ações. O consumo de etanol foi expresso como gramas de etanol por quilograma de peso corporal pelo consumo absoluto pelo período de 5 horas. A posição das garrafas foi trocada diariamente para evitar o viés de posição. Com objetivo de testar o impacto dos receptores dopaminérgicos no padrão de consumo de etanol em camundongos $\text{Prnp}^{+/+}$ e $\text{Prnp}^{0/0}$, os camundongos foram previamente tratados (30 min.) com antagonistas dos receptores dopaminérgicos D_1 (SCH-23390, 0.1 mg/kg, i.p.) ou D_2 (sulpirida, 80 mg/kg, i.p.).

3.3 Administração intracerebroventricular (i.c.v.) free-hand

As administrações intracerebroventriculares (i.c.v.) *free-hand* foram feitas utilizando-se uma microsseringa (5 μl , Hamilton, Reno, Nevada, EUA) conectada a uma agulha que foi inserida a 3 mm de profundidade perpendicular a superfície do crânio, de acordo com o procedimento originalmente descrito por Haley e McCormick (1957) e modificado por Maurice *et al.* (1996). Os camundongos foram anestesiados com isoflurano (Abbot Laboratórios do Brasil Ltda., RJ, Brasil) por um sistema de vaporização (SurgiVet Inc., WI, EUA) e então imobilizados para as injeções i.c.v. A agulha foi inserida unilateralmente a 1 mm à direita da linha média e equidistante a cada olho e perpendicular ao plano do crânio.

Um volume de 3 µl de PBS ou de α -GST-PrP^C (50, 150 or 300 ng/µl) foi administrado diretamente no ventrículo lateral. Uma vez os experimentos finalizados, todos os camundongos foram decapitados e seus cérebros examinados para excluir possíveis erros de administração, ou hemorragia cerebral. Menos de 5 % dos animais foram eliminados.

3.4 Administração intracerebroventricular (cirurgia estereotáxica)

Os camundongos foram anestesiados com hidrato de cloral 5% e colocados em um aparelho estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, EUA), com o bregma e o lambda mantidos no mesmo plano horizontal. Uma perfuração foi realizada no crânio dos animais e uma cânula-guia foi inserida até atingir o ventrículo lateral. As coordenadas estereotáxicas utilizadas foram retiradas do atlas neuroanatômico de camundongos (Paxinos e Franklin, 2001). O procedimento experimental foi realizado 7 dias após a cirurgia. Uma agulha injetora foi acoplada à cânula-guia e as infusões i.c.v. foram feitas utilizando-se uma microseringa de 10 µl (Hamilton) através de um tubo de polietileno (PE 10). As drogas foram injetadas manualmente em um volume total de 3 µl. A agulha injetora foi mantida por mais 30 segundos depois da administração. Depois dos experimentos os animais foram anestesiados e foi injetada solução de azul de Evans (0.1%) através da cânula-guia. Todos os animais tiveram cirurgia com colocação correta da cânula.

3.5 Ensaios Neuroquímicos

3.5.1 Imunodeteção de proteínas

Os camundongos foram anestesiados com isofluorano (Abbot Laboratórios do Brasil Ltda., RJ, Brasil) e decapitados, as estruturas cerebrais [bulbo olfatório (BO), córtex pré-frontal (CPF), estriado (EST) e hipocampo (HIP)] foram dissecadas e homogeneizadas em tampão mantido gelado, contendo 10 mM de HEPES (pH 7,4), 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil, 5 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml pepstatina A, 10 µg/ml aprotinina, 1 mmol/l ortovanadato de sódio, 10 mmol/l β -glicerolfosfato, 50 mmol/l fluoreto de sódio, e and 0,5 mmol/l ditiotreitól (todos adquiridos da Sigma-Aldrich, USA). Os homogenatos foram resfriados em gelo por 15 minutos e misturados por mais 15 minutos na presença de 0,1% de Triton 15 e então centrifugados a 10.000 g por 30 minutos. O sobrenadante foi coletado como a fração citosólica e estocado a temperatura de -70°C até o uso (Medeiros, Prediger *et al.*, 2007). A concentração de proteínas foi determinada utilizando-se um kit específico (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canadá). As proteínas e os marcadores de peso

molecular foram revelados utilizando-se a marcação de vermelho de Ponceau. O bloqueio das membranas foi feito com salina tamponada (PBS constituída por 140 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 20 mM de NaH_2PO_4 , e 15 mM KH_2PO_4 , com pH 7,4) contendo 5% de leite em pó e 0,05% de Tween-20 por uma hora a 25°C. As membranas foram então incubadas *overnight* a 4°C com um anticorpo anti-tirosina hidroxilase (1:1,000; MAB1423, R&D, Minneapolis, MN, EUA) em solução de bloqueio com um anticorpo anti-camundongo IgG (1:1,000; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) por 1 hora. A visualização foi feita utilizando-se o sistema de ECL (PerkinElmer).

3.5.2 Análise do conteúdo de monoaminas (HPLC)

Utilizamos um protocolo previamente validado de HPLC para determinar os níveis de monoaminas (dopamina, noradrenalina e serotonina) e seus principais metabólitos (Dombrowski, Carvalho *et al.*, 2010). Após dissecação das estruturas de interesse (BO, CPF, EST e HIP) estas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70 °C. O sistema de HPLC consistiu de uma bomba LC-20AT (Shimadzu, São Paulo, Brasil) equipada com um injetor Rheodyne 7725 que alimenta a coluna de fase-reversa Synergy Fusion-RP C-18 de dimensões (150 x 4,6 mm, com 4 µm de tamanho de partícula) protegida por uma pré-coluna de 4 x 3,0 mm (SecurityGuard Cartridges Fusion-RP), mantidas dentro de um compartimento de temperatura controlada (25°C; Shimadzu). As monoaminas foram identificadas com um detector eletroquímico (ESA Coulochem III Electrochemical Detector). As amostras foram então homogeneizadas com um sonicador em solução de ácido perclórico 0,1 M contendo metabissulfeto sódico. Após centrifugação a 10.000 g por 30 minutos a 4 °C, 20 µl do sobrenadante foi injetado no cromatógrafo. A fase móvel, em razão de vazão de 1 ml/minuto, teve a seguinte composição: 20 g ácido cítrico monohidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), 200 mg de ácido octa-sulfônico (Merck, Darmstadt, Alemanha), 40 mg EDTA (Sigma), 900 ml água para HPLC. Metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi adicionado para obter uma solução contendo 10% de metanol (v/v). O pH do tampão de corrida foi ajustado para 4,0 e então filtrado. As áreas dos picos dos padrões externos foram utilizadas para quantificar os picos das amostras.

3.5.3 Análises imunocitoquímicas para determinação da presença da PrP^{C} no sistema dopaminérgico.

Ratos Wistar fêmeas grávidas (Charles River, Barcelona, Espanha) foram anestesiadas com halotano (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e os fetos removidos no período embrionário 16, para preparação das culturas de

neurônios mesencefálicos como descrito previamente (Fath, Ke *et al.*, 2009). O mesencefalo ventral foi dissecado em solução de Hank, fatiado e incubado por 15 minutos a 37° C em meio de MEM, contendo 0,05 % de Tripsina e 0,001 de DNase I. O tecido foi então lavado com MEM, contendo 0,052 % de inibidor de tripsina e gentilmente dissociado com uma pipeta de 5 ml, para obter uma suspensão de células individuais dispersas. As células foram emplantadas em aproximadamente 85,000 células/cm², em meio neurobasal contendo 10% de soro fetal inativado, 2% de B27, 1% de glutamax e 1% de penicilina/estreptomicina. Após 24 horas, o meio foi trocado e as culturas mantidas por 7 dias *in vitro* (DIV) em meio neurobasal nas mesmas condições anteriores em incubadoras umidificadas. As células foram então fixadas com 4% de paraformaldeído por 30 minutos e lavadas duas vezes com PBS. As células foram permeabilizadas com PBS contendo 0,2% de Triton X-100 por 10 minutos, bloqueadas por 1 hora em PBS contendo 3% de soro albumina e 5% de soro de cavalo, lavados novamente duas vezes com PBS e incubados *overnight* a 4° C com diferentes misturas de anticorpos: anti-PrP^C (1:100; 8H4, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) ou anti-PrP^C (1:1000; 6D11 Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), além de anti-DAT (1:500; Millipore Billerica, MA, EUA) ou anti-TH (1:1000; MAB1423, R&D, Minneapolis, MN, EUA). As células foram então lavadas com PBS com 3% de soro albumina bovina e incubados por 1 hora em temperatura ambiente com anticorpos AlexaFluor-598 (vermelho) ou anti-rato IgG ou com anticorpos AlexaFluor-488 (verde) ou anti-rato IgG (1:200; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As células foram então lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com DAPI por 15 minutos. Após a lavagem e montagem das lâminas, com *anti-fade*, as preparações foram visualizadas e as imagens adquiridas com um microscópio confocal Zeiss LSM510 META (Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha) utilizando uma objetiva de 63x Plan-ApoChromat (1.4 de abertura). As imagens foram analisadas com o software LSM510.

3.5.4 Autorradiografia

Camundongos Prnp^{+/+} e Prnp^{0/0} foram decapitados e os cérebros imediatamente congelados e mantidos a -80 °C até processamento das amostras. Utilizando um criostato, secções coronais (de 20 µm) sequenciais dos estriados dos animais foram produzidas. Para o ensaio de ligação para os receptores dopaminérgicos D₁ utilizou-se o [³H]-SCH-23390 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), para os receptores dopaminérgicos D₂ o [³H]-raclopride (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e a densidade de DAT foi avaliada pela ligação do [³H]-WIN-35248 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). As fatias foram pré-incubadas com 50 mM de tampão Tris (pH 7,4) contendo 120 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 1 mM EDTA e 1,5

mM CaCl_2 , por 30 minutos (para o receptor D_1 e DAT) ou 15 minutos (para o receptor D_2). As fatias foram então incubadas em tampão Tris contendo 2 ηM de [^3H]-SCH-23390 (86,0 Ci/mmol, Perkin Elmer Life Science, Boston, EUA) por 90 min a 37 °C (receptor D_1), 2 ηM [^3H]-raclopride (76,0 Ci/mmol, Perkin Elmer Life Science, Boston, EUA) por 2 horas em temperatura ambiente (para o receptor D_2) ou em tampão contendo 10 ηM [^3H]-WIN 35248 (85,0 Ci/mmol; Perkin-Elmer Life Science, Boston, EUA) por 2 horas em temperatura ambiente. As fatias foram lavadas uma (receptor D_1) ou duas vezes (receptor D_2 e DAT) em solução gelada de tampão Tris por 5 minutos. As fatias foram expostas a filmes Kodak Biomax MR-1 dentro de cassetes de tungstênio junto a padrões calibrados por 4 semanas. Todos os grupos foram representados em cada filme de revelação. Os filmes foram processados e as análises densitométricas foram mensuradas utilizando o sistema MCID (Imaging Research, St. Catherine's, Ontario, Canadá). O mínimo de 5 fatias foram medidas para se obter os valores para cada animal e para cada região do estriado. As regiões do estriado foram definidas de acordo com o atlas neuroanatômico de Paxinos e Franklin (Paxinos e Franklin, 2001) como observado na Figura 8a.

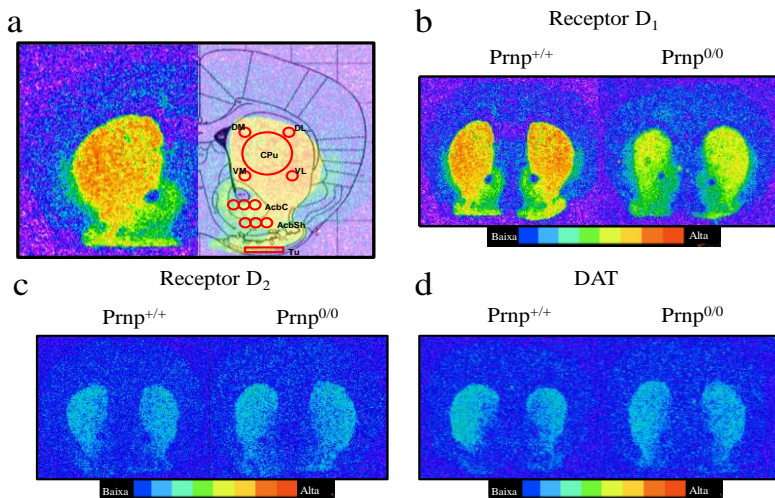


Figura 8. Representação das subregiões do estriado utilizadas para o teste de autorradiografia (a). Marcação basal para receptores D_1 (b), D_2 (c) e DAT (d).

3.5.5 Imunohistoquímica para expressão da DARPP-32 no estriado

A expressão da DARPP-32 total (tDARPP-32) foi avaliada no estriado de camundongos Prnp^{+/+} (n=4) e nocautes para PrP^C (Prnp^{0/0}) (n=4) utilizando um anticorpo anti-DARPP-32 (1:500; Cell Signaling Technology, MA, EUA). O anticorpo DAPI (Cell Signaling Technology, MA, EUA) foi utilizado com intuito de marcar os núcleos celulares e foi diluído na proporção de 1:200. As fatias foram visualizadas e as imagens adquiridas em um microscópio confocal Zeiss LSM510 META (Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha) utilizando-se a objetiva de 63X com o software LSM510. A quantificação foi determinada pela razão entre a imunomarcagem de tDARPP-32 e a de DAPI, com intuito de normalizar a marcação pelo número de células nas amostras.

3.5.6 Quantificação de etanol sanguíneo

Amostras de sangue foram coletadas dos animais pela perfuração da cauda após o teste de atividade locomotora no campo aberto nos dias 1, 7, 14 e 21, e após os dias 1 e 2 do teste de aquisição da tolerância rápida no rotarod. A concentração de etanol no sangue foi avaliada enzimaticamente através da conversão do etanol em acetaldeído pela ação da álcool-desidrogenase (Poklis e Mackell, 1982).

3.6 Procedimentos para eletrofisiologia extracelular cortico-estriatal

Fatias de estriado foram obtidas de camundongos C57Bl/6 fêmeas de 6 a 8 semanas de idade (Charles River, Barcelona, Espanha). Os animais foram anestesiados com halotano (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e decapitados. Os cérebros foram rapidamente removidos e imersos em líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF) gelado contendo (em mM): 124 de NaCl, 4,5 de KCl, 2 de CaCl₂, 1 de MgCl₂, 26 de NaHCO₃, 1,2 de NaH₂PO₄ e 10 de D-glicose, gazeados com uma mistura de 95% O₂ / 5% CO₂. O tecido foi completamente submerso em aCSF gelado e seccionado no sentido coronal em fatias de 400 µm de espessura, utilizando um sistema de secção (Vibratome 1500, Leica, Wetzlar, Alemanha). As fatias permaneceram em repouso por no mínimo 90 minutos em temperatura ambiente, imersas em aCSF e continuamente gazeadas a 95% de O₂ / 5% de CO₂. As fatias foram então transferidas para a câmara de registro submerso. Os potenciais de campo extracelulares foram obtidos com micropipetas (2–4 MΩ) preenchidas com uma solução de 4 M de NaCl. Os estímulos elétricos foram gerados por um estimulador S44 (Grass Instruments, West Warwick, RI, EUA) em uma frequência de 0,05 Hz, através de um eletrodo

bipolar posicionado na matéria branca sobre o estriado dorso-medial. As leituras foram medidas como *Population Spikes*, para estimativa da eficácia sináptica (Yin, Park *et al.*, 2007). O protocolo de estimulação de alta frequência (do inglês *High frequency stimulation, HFS*), consiste de 3 trens de 100 Hz durante 1 segundo com intervalos de 5 segundos entre os trens. Os registros foram obtidos por um amplificador ISO-80 (World Precision Instruments, Hertfordshire, Inglaterra) e digitalizados por um sistema ADC-42 (Pico Technologies, Pelham, NY, EUA). As médias de 4 respostas consecutivas foram continuamente monitoradas em um computador com o software LTP 1.01 (Anderson and Collingridge, 2001).

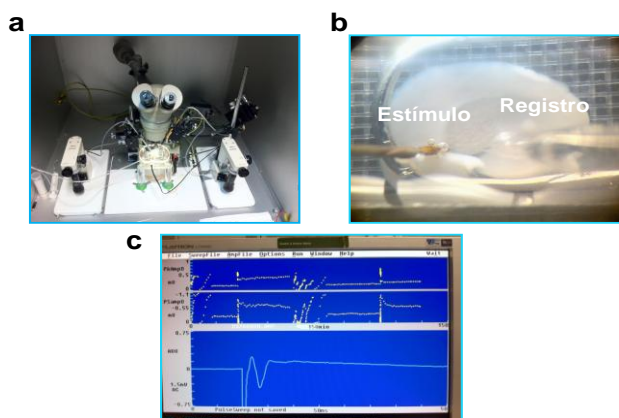


Figura 9. Vista geral do sistema de eletrofisiologia extracelular utilizado (a). (b) Posicionamento do eletrodo de estímulo e da pipeta de registro em uma fatia cortico-estriatal de camundongo. (c) Registro típico obtido após amplificação do sinal.

3.7 Análises estatísticas

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para comparações simples (normalmente efeitos do fator genótipo) foi utilizado o teste *t* de Student. As demais comparações estatísticas foram realizadas através da análise de variância (ANOVA) de uma, duas ou três vias, em comparações multifatoriais. ANOVA com medidas repetidas foi utilizada para tratamentos repetidos. Genótipo, tratamento e tempo foram

definidos como variáveis independentes (fatores preditivos). Posteriormente, os grupos foram comparados entre si empregando-se o teste *post-hoc* de Newman-Keuls. A probabilidade aceita como indicativo da existência de diferença estatisticamente significativa foi $P < 0,05$. Todos os testes foram analisados utilizando-se o programa Statistica® (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

4. RESULTADOS

4.1 Camundongos nocautes para PrP^C apresentam aumento do comportamento de escalada que é bloqueado pela administração de antagonistas dopaminérgicos

Em nossas observações preliminares, os animais $Prnp^{0/0}$ apresentavam um aumento atípico no comportamento de escalada em suas gaiolas moradias, que é sugestivo de modificação no funcionamento do sistema dopaminérgico (Fetsko, Xu *et al.*, 2003). Decidimos então, comparar a expressão deste comportamento em animais controles ($Prnp^{+/+}$) e nocautes ($Prnp^{0/0}$) em gaiolas apropriadas. Os resultados indicam que os animais nocautes para a PrP^C passam mais tempo em comportamento de escalada do que os respectivos controles ($Prnp^{+/+}$) ($Prnp^{+/+}$) [$(F_{1, 17}) = 18,5$ $P < 0,05$] (Figura 10a). Além disso, utilizamos outra linhagem de animais nocautes para PrP^C , denominados *Edinburgh* ($EPrnp^{-/-}$), e estes também apresentaram aumento no comportamento de escalada, quando comparado aos camundongos heterozigotos para a PrP^C ($EPrnp^{+/-}$) e controles ($EPrnp^{+/+}$) [$(F_{2, 11}) = 11,9$ $P < 0,05$], seguido de *post-hoc* de Newman-Keuls (Figura 10b).

Para confirmar a influência do sistema dopaminérgico nesta resposta exacerbada dos camundongos $Prnp^{0/0}$, administramos a estes animais antagonistas seletivos dos receptores dopaminérgicos D_1 (SCH-23390) ou D_2 (sulpirida). Ambos os antagonistas diminuíram o tempo gasto em comportamento de escalada nos camundongos $Prnp^{0/0}$ [$(F_{2, 24}) = 15,1$ $P < 0,05$] (Figura 10c). Alternativamente, procuramos modular a mesma resposta de aumento do comportamento de escalada através do bloqueio farmacológico da PrP^C através da administração i.c.v. do anticorpo anti-prion (α -GST- PrP^C). Nossos resultados indicam que a administração deste anticorpo não modifica o perfil do comportamento de escalada em animais C57Bl/6 [$(F_{2, 12}) = 0,05$ $P > 0,05$] (Figura 10d).

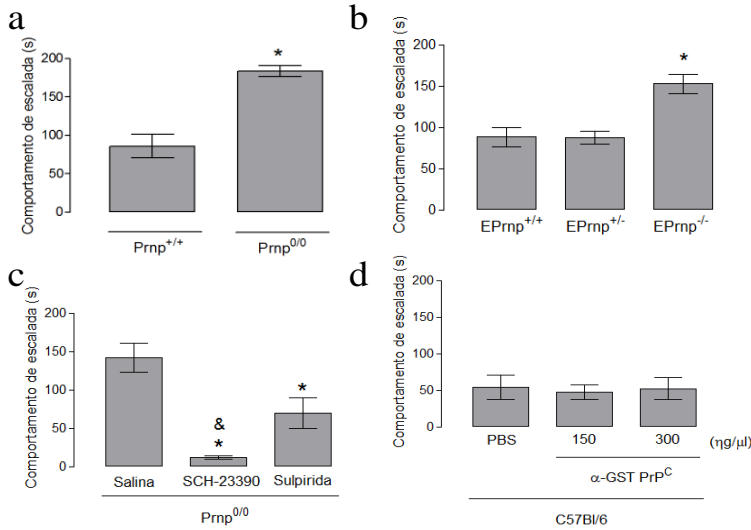


Figura 10. Avaliação do comportamento de escalada em camundongos $Prnp^{+/+}$ e $Prnp^{0/0}$ (a), em camundongos $EPrnp^{+/+}$, $EPrnp^{+/-}$ e $EPrnp^{-/-}$ (b). Efeito do pré-tratamento com antagonistas dos receptores dopaminérgicos D_1 (SCH-23390) e D_2 (Sulpirida) em camundongos $Prnp^{0/0}$ (c). (d) Efeito do bloqueio farmacológico com o anticorpo anti-prion (α -GST-PrP^C) no comportamento de escalada de camundongos C57Bl/6. * $P < 0,05$ comparado ao respectivo grupo controle e & $P < 0,05$ comparado ao grupo tratado com sulpirida. Teste *t* de Student em (a) e ANOVA de uma via em (b-d) ($n = 8-10$ animais por grupo).

4.2 A deleção gênica da PrP^C promove alterações do sistema dopaminérgico na via mesocorticolímbica

A investigação de possíveis alterações do sistema dopaminérgico em camundongos $Prnp^{0/0}$ foi inicialmente realizada através da quantificação da imunorreatividade da tirosina hidroxilase (TH), enzima passo limitante para formação de neurotransmissores catecolaminérgicos. Foram investigadas regiões cerebrais sabidamente ricas em dopamina como o bulbo olfatório (BO), o córtex pré-frontal (CPF), o estriado (EST) e o hipocampo (HIP) (Figura 11a). Surpreendentemente, os resultados indicam diminuição na expressão de TH no BO e no CPF de camundongos $Prnp^{0/0}$ quando comparados com os camundongos $Prnp^{+/+}$, enquanto que níveis semelhantes desta enzima foram encontrados no estriado e no hipocampo das duas linhagens (Figura 11b). De maneira consistente com os dados da expressão da TH, os camundongos $Prnp^{0/0}$ apresentaram níveis de dopamina

reduzidos no BO e no CPF (Figura 11c), sem serem observadas alterações significantes no estriado e no hipocampo (Figura 11d).

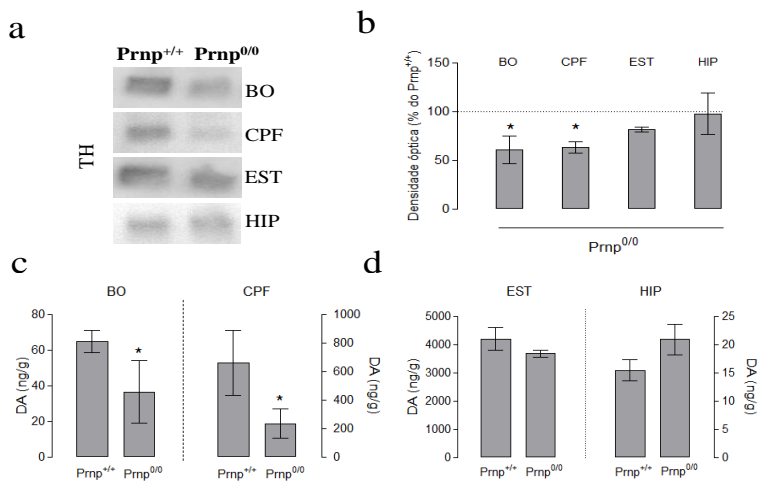


Figura 11. Avaliação das características neuroquímicas do sistema dopaminérgico em diferentes áreas cerebrais de camundongos Prnp^{+/+} e Prnp^{0/0}. (a) Expressão de TH no BO, CPF, EST e HIP de camundongos Prnp^{+/+} e Prnp^{0/0} e (b) Densidade óptica das bandas obtidas por Western Blot normalizadas em relação ao controle. (c) e (d) quantificação dos níveis de dopamina no BO, CPF, EST e HIP de camundongos Prnp^{+/+} e Prnp^{0/0}. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle. Teste t de Student ($n=4-6$ animais por grupo).

Em adição, não foram observadas diferenças genotípicas quanto aos níveis de serotonina e noradrenalina em nenhuma região cerebral avaliada (Tabela 1).

Tabela 1. Níveis de Serotonina e Noradrenalina em diferentes regiões cerebrais de camundongos $Prnp^{+/+}$ e $Prnp^{0/0}$

Genótipo	Região cerebral	Serotonina (ng/g)	Noradrenalina (ng/g)
$Prnp^{+/+}$	BO	401,5 \pm 37,7	165,0 \pm 27,1
$Prnp^{0/0}$	BO	482,9 \pm 24,6	161,4 \pm 16,7
$Prnp^{+/+}$	CPF	1341,8 \pm 120,5	454,4 \pm 26,7
$Prnp^{0/0}$	CPF	1443,7 \pm 70,9	498,3 \pm 23,9
$Prnp^{+/+}$	EST	1638,0 \pm 73,7	513,3 \pm 114,3
$Prnp^{0/0}$	EST	1600,3 \pm 119,5	460,3 \pm 92,7
$Prnp^{+/+}$	HIP	1241,7 \pm 72,6	580,1 \pm 16,7
$Prnp^{0/0}$	HIP	1409,7 \pm 45,4	590,2 \pm 14,1

4.3 Deleção genética da PrP^C altera a densidade dos receptores dopaminérgicos do tipo D_1 no estriado

Apesar de não termos encontrado diferenças na expressão de TH ou de conteúdo dopaminérgico no estriado dos camundongos $Prnp^{0/0}$, considerando que esta é uma estrutura sabidamente envolvida com o comportamento de escalada em roedores (Bordi, Carr *et al.*, 1989), decidimos avaliar a densidade dos receptores dopaminérgicos D_1 , D_2 e do transportador de dopamina (DAT) em sub-regiões do estriado [Caudado Putamen (CPu), Caudado Putamen dorso-medial (CPuDM), Caudado Putamen dorso-lateral (CPuDL), Núcleo accumbens core (AccCore), Núcleo accumbens Shell (AccShell), Caudado Putamen ventro-medial (CPuVM), Caudado Putamen ventro-lateral (CPuVL) e Tubérculo olfatório (Tu)] de camundongos $Prnp^{+/+}$ e $Prnp^{0/0}$ utilizando a técnica de autorradiografia. De maneira geral, os camundongos $Prnp^{0/0}$ apresentaram uma diminuição da densidade de receptores dopaminérgicos D_1 em todas as subregiões do estriado (CPu $t_{2,0,05}=4,7$ $P<0,05$; CPuDM $t_{2,0,05}=3,6$ $P<0,05$; CPuDL $t_{2,0,05}=6,1$ $P<0,05$; AccCore $t_{2,0,05}=3,9$ $P<0,05$; AccShell $t_{2,0,05}=3,2$

$P<0,05$; CPuVM $t_{2,0,05}=3,7$ $P<0,05$; CPuVL $t_{2,0,05}=7,4$ $P<0,05$; Tu $t_{2,0,05}=4,5$ $P<0,05$), mas sem qualquer alteração na densidade de receptores dopaminérgicos D₂ (CPu $t_{2,0,05}=0,1$ $P>0,05$; CPuDM $t_{2,0,05}=1,2$ $P>0,05$; CPuDL $t_{2,0,05}=1,1$ $P>0,05$; AccCore $t_{2,0,05}=1,2$ $P>0,05$; AccShell $t_{2,0,05}=1,4$ $P>0,05$; CPuVM $t_{2,0,05}=1,3$ $P>0,05$; CPuVL $t_{2,0,05}=1,9$ $P>0,05$; Tu $t_{2,0,05}=0,1$ $P<0,05$) e DAT (CPu $t_{2,0,05}=1,4$ $P>0,05$; CPuDM $t_{2,0,05}=1,2$ $P>0,05$; CPuDL $t_{2,0,05}=1,7$ $P>0,05$; AccCore $t_{2,0,05}=0,8$ $P>0,05$; AccShell $t_{2,0,05}=0,9$ $P>0,05$; CPuVM $t_{2,0,05}=2,0$ $P>0,05$; CPuVL $t_{2,0,05}=1,2$ $P>0,05$; Tu $t_{2,0,05}=1,6$ $P<0,05$), quando comparados com os camundongos controle (Prnp^{+/+}).

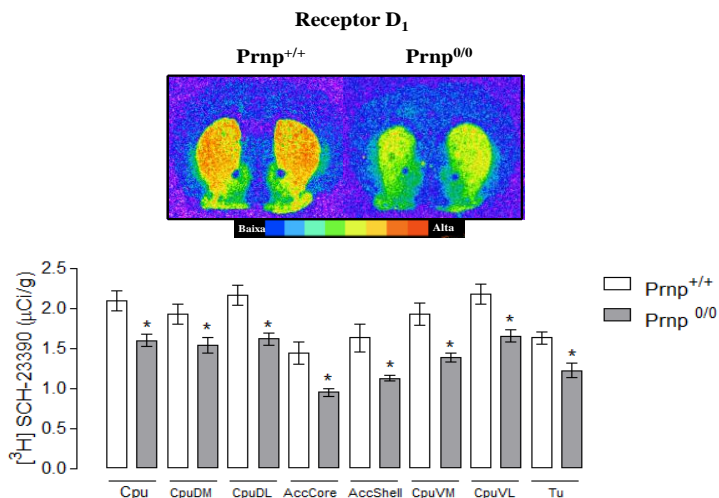


Figura 12. Avaliação da densidade de receptores D₁ em subregiões estriatais de camundongos Prnp^{+/+} e Prnp^{0/0}. * $P<0,05$ comparado à mesma subregião do grupo controle. Teste *t* de Student (n=4-6 animais por grupo).

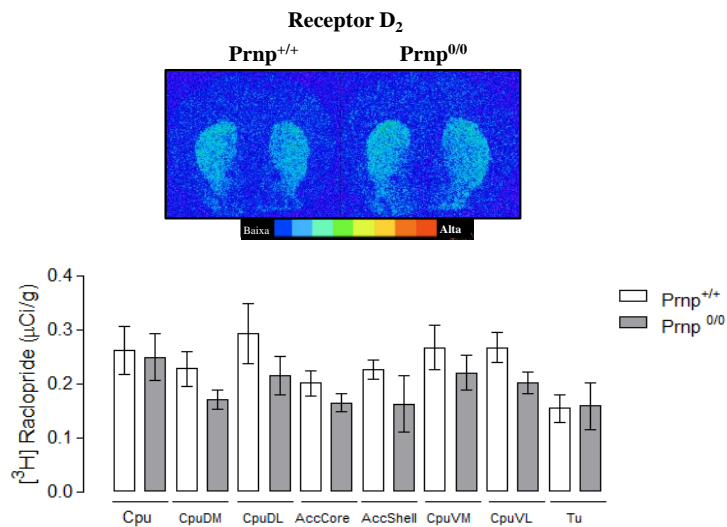


Figura 13. Avaliação da densidade de receptores D₂ em subregiões estriatais de camundongos Prnp^{+/+} e Prnp^{0/0}. (n=4-6 animais por grupo).

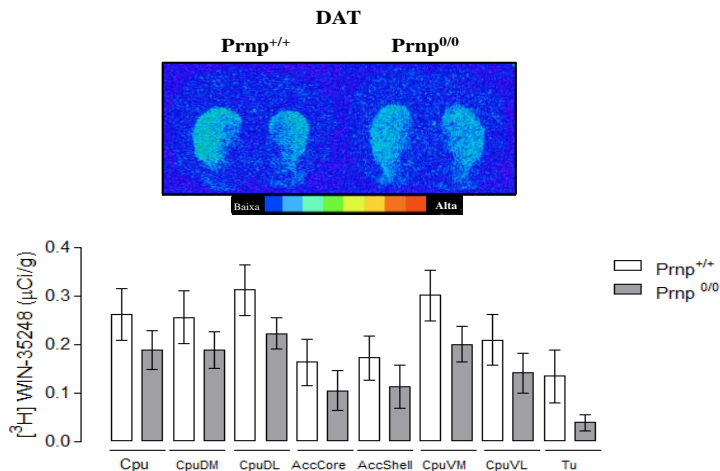


Figura 14. Avaliação da densidade de transportadores de dopamina (DAT) em subregiões estriatais de camundongos Prnp^{+/+} e Prnp^{0/0}. (n=4-6).

Em seguida, avaliamos a expressão da DARPP-32, uma proteína que indica ativação dos receptores dopaminérgicos (Svenningsson et al., 2004), também em fatias do estriado de animais Prnp^{+/+} e Prnp^{0/0}. Nosso resultados indicam que a deleção gênica da PrP^C altera a expressão da DARPP-32. Como observado na Figura 15, o estriado de camundongos Prnp^{0/0} apresenta menor imunomarcação para esta proteína quando comparado com o grupo Prnp^{+/+} ($t_{2,0.05}=3,7$ $P<0,05$) (Figura 15b).

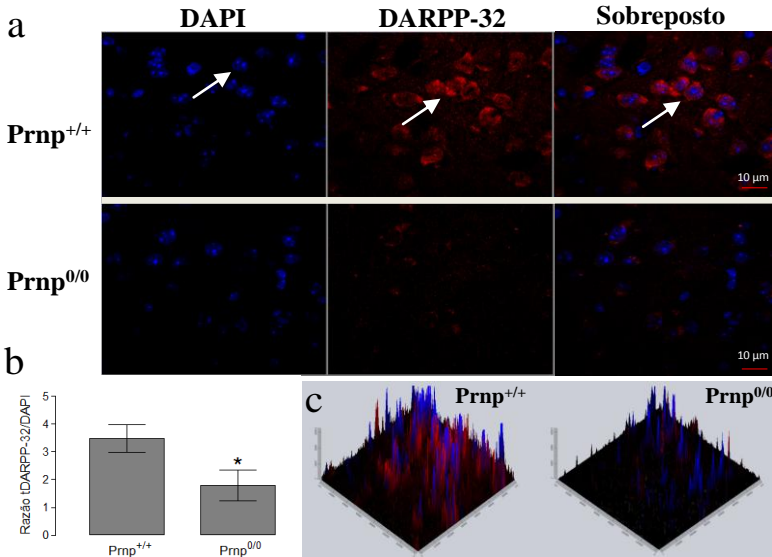


Figura 15. Avaliação da expressão de DARPP-32 em fatias estriatas de camundongos $Prnp^{+/+}$ e $Prnp^{0/0}$ (a) Marcação nuclear com DAPI (marcação azul nos primeiros painéis à esquerda como indicado pela seta), marcação com anticorpo para DARPP-32 (vermelha, painéis centrais, indicado pela seta branca) e imagens sobrepostas (painéis à direita, também indicados pela seta). (b) Quantificação da razão entre a expressão de tDARPP-32/DAPI. $*P < 0,05$ em comparação com o grupo controle. Teste t de Student. (c) Figura 2,5D mostrando a média dos padrões de expressão de DAPI (azul) e tDARPP-32 (vermelho) ($n=4-6$ fatias).

4.4. Evidências da existência da PrP^C em neurônios dopaminérgicos

De com um estudo prévio, a presença da PrP^C em neurônios dopaminérgicos é questionável (Ford, Burton *et al.*, 2002), por isso, resolvemos realizar estudos complementares para detectar a presença da PrP^C em neurônios dopaminérgicos. O primeiro passo foi dado pela análise por Western blot (Figura 16a) demonstrando a presença da PrP^C em frações de terminais nervosos e em membranas totais, preparadas a partir de estriados.

Confirmamos esta afirmação pela análise imunocitoquímica de terminais nervosos purificados (Figura 16a). A seletividade dos dois anticorpos anti-prion (que reconhecem dois epítopos diferentes) foi confirmada pela ausência de sinal em terminais nervosos estriatais

providos de animais $Prnp^{0/0}$ (Figura 16b). Por fim, a avaliação imunocitoquímica revelou um percentual de co-localização de aproximadamente 25% dos terminais nervosos estriatais TH-positivos e DAT-positivos em amostras de camundongos $Prnp^{+/+}$ (Figuras 16c-d). Para confirmação destes achados, utilizamos culturas de neurônios mesencefálicos de camundongos $Prnp^{+/+}$ novamente utilizando dois anticorpos para diferentes epítomos da PrP^C (Figuras 16e-g).

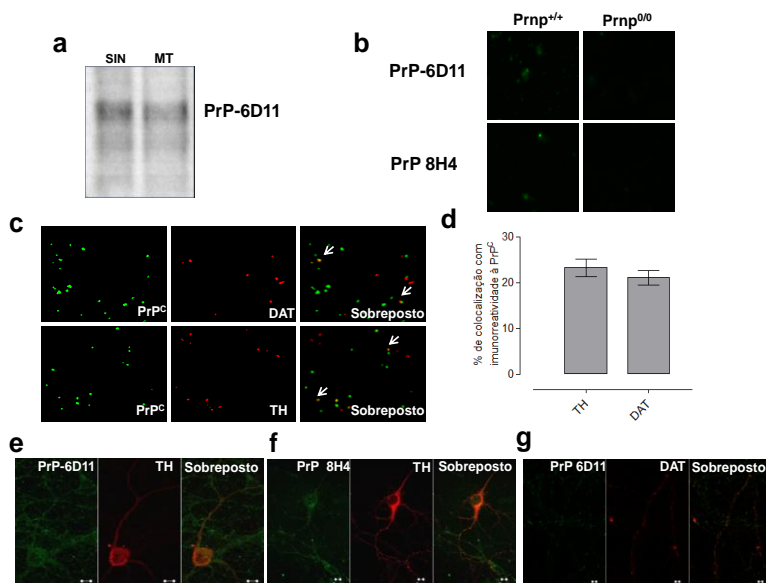


Figura 16. Avaliação da co-localização da PrP^C com o sistema dopaminérgico (a) Western blot para detecção da PrP^C em sinaptossomas e membranas totais. (b) Confirmação da presença da PrP^C em marcações utilizando material provindo de camundongos $Prnp^{+/+}$ e ausência da mesma marcação em $Prnp^{0/0}$. (c) Co-localização da PrP^C em sinaptossomas TH e DAT positivos. (d) Quantificação da porcentagem de co-localização entre a PrP^C e sinaptossomas TH e DAT positivos. (e-g) Confirmação da co-localização da PrP^C em neurônios mesencefálicos TH ou DAT positivos utilizando dois anticorpos para epítomos diferentes.

4.5 Deleção genética ou o bloqueio farmacológico da PrP^C altera o padrão da atividade locomotora induzida pelo etanol

Tendo em vista as alterações do sistema dopaminérgico causadas pela deleção da PrP^C, e que esta deleção gênica tem impacto importante em áreas cerebrais relevantes para a adição de drogas, nos pareceu razoável a hipótese de que PrP^C poderia influenciar a resposta à drogas com propriedades aditivas. Desta maneira, resolvemos inicialmente investigar a influência do etanol na atividade locomotora de camundongos Prnp^{0/0} e Prnp^{+/+} no teste do campo aberto. A administração aguda de etanol (2 g/kg, i.p.) promoveu o aumento da atividade locomotora de camundongos Prnp^{0/0}, mas não dos camundongos Prnp^{+/+} (Figura 17a) [(genótipo: ($F_{1, 35}$) = 11,3 $P < 0,05$), (tratamento: ($F_{1, 35}$) = 17,4 $P < 0,05$), (interação: ($F_{1, 35}$) = 1,4 $P > 0,05$)]. O mesmo padrão de resposta foi observado depois de 7, 14 e 21 dias da administração repetida de etanol (2 g/kg, i.p.) (Figura 17b) [(Dia 7 genótipo: ($F_{1, 36}$) = 10,7 $P < 0,05$), (Dia 7 tratamento: ($F_{1, 36}$) = 11,8 $P < 0,05$), (interação: ($F_{1, 36}$) = 3,6 $P > 0,05$), (Dia 14 genótipo: ($F_{1, 36}$) = 2,5 $P > 0,05$), (Dia 14 tratamento: ($F_{1, 36}$) = 21,4 $P < 0,05$ (interação: ($F_{1, 36}$) = 3,1 $P > 0,05$), (Dia 21 genótipo: ($F_{1, 36}$) = 4,8 $P < 0,05$), (Dia 21 tratamento: ($F_{1, 36}$) = 12,3 $P < 0,05$ (interação: ($F_{1, 36}$) = 2,3 $P > 0,05$)]. O peso dos animais e os níveis de etanol no sangue não diferiram entre os genótipos ou tratamentos durante os 21 dias de análise (Tabelas 2 e 3 respectivamente).

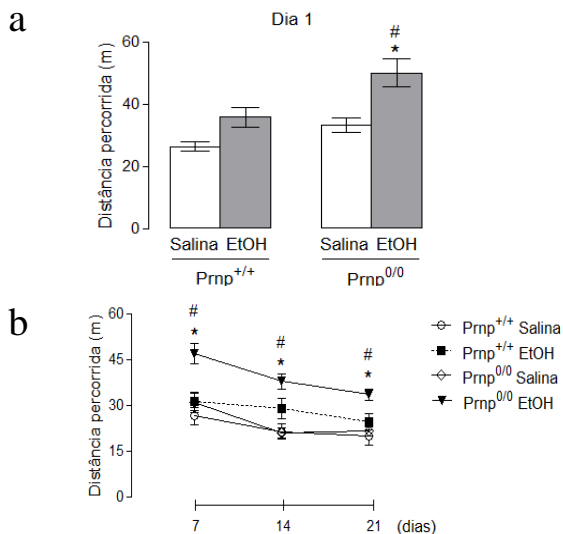


Figura 17. Avaliação da resposta locomotora ao etanol em camundongos Prnp^{+/+} e Prnp^{0/0} no teste do campo aberto (10 min) (a) Avaliação da resposta a uma única administração de etanol nos dois genótipos de camundongos. (b) Avaliação da resposta locomotora ao tratamento repetido (7, 14 e 21 dias) com etanol nos dois genótipos de camundongos. * $P < 0,05$ comparado ao grupo tratado com salina de mesmo genótipo e # $P < 0,05$ comparado ao grupo controle tratado com etanol. ANOVA de duas vias seguida de *post-hoc* de Newman-Keuls. (n=8-10 animais por grupo)

Tabela 2. Massa corpórea dos animais tratados repetidamente com etanol (2 g/kg, i.p.) avaliados no teste de atividade locomotora do campo aberto.

Genótipo	Tratamento	Massa corpórea (g)			
		<i>Dia 1</i>	<i>Dia 7</i>	<i>Dia 14</i>	<i>Dia 21</i>
Prnp^{+/+}	Salina	23,4±0,33	22,0±0,39	22,2±0,32	21,1±0,43
	Etanol	23,1 ±0,76	21,5± 0,74	21,9±0,70	22,3 ±0,71
Prnp^{0/0}	Salina	23,3 ±0,76	21,8±0,64	22,5±0,67	22,9±0,64
	Etanol	23,9 ±0,52	21,8±0,53	21,6±0,37	22,0±0,42

Tabela 3. Concentração de etanol no sangue dos animais tratados repetidamente com etanol (2 g/kg, i.p.) avaliados no teste de atividade locomotora do campo aberto

Concentração de etanol no sangue (mg/dl)					
Genótipo	Tratamento	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21
Prnp ^{+/+}	Etanol	106,0 \pm 0,91	114,0 \pm 0,91	105,0 \pm 0,91	111,0 \pm 0,97
Prnp ^{0/0}	Etanol	115,0 \pm 0,91	105,0 \pm 0,91	104,0 \pm 0,91	117,0 \pm 1,7

Depois de 21 dias de tratamento repetido com etanol (2 g/kg, i.p.), realizamos também uma avaliação histopatológica dos fígados dos camundongos Prnp^{+/+} e Prnp^{0/0}. Nenhum dos fígados avaliados apresentou sinais de esteatose, cirrose ou infiltrados linfocíticos evidentes (Figura 18a-b).

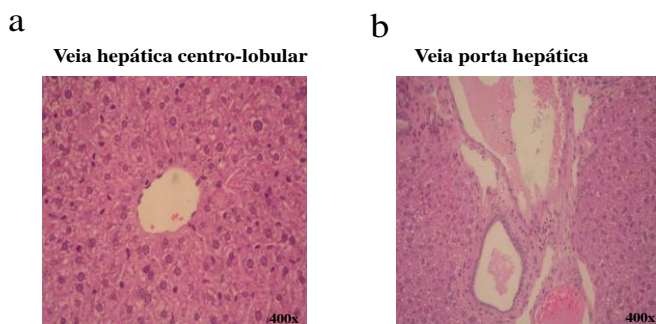


Figura 18. Ausência de lesões hepáticas após o tratamento repetido com etanol (2 g/kg, i.p.) durante 21 dias em camundongos $Prnp^{+/+}$ e $Prnp^{0/0}$ (a) Avaliação de cirrose hepática, esteatose ou infiltrados linfocitários na região da veia hepática centro-lobular e (b) na veia porta hepática. (n=4-6).

Nosso próximo passo foi testar se a alteração na resposta locomotora induzida pelo etanol em camundongos $Prnp^{0/0}$ poderia ser reproduzida pelo bloqueio farmacológico agudo da PrP^C . Para isso administramos pela via i.c.v. o anticorpo anti-prion (α -GST- PrP^C) em camundongos C57Bl/6 em três concentrações diferentes (50, 150 and 300 g/ μ l) 30 minutos antes da administração de etanol (2 g/kg, i.p.). Em camundongos C57Bl/6, o etanol promoveu uma redução da atividade locomotora, que foi prontamente prevenida pela administração i.c.v. do anticorpo anti-prion de maneira dose-dependente (Fig. 19) [(pré-tratamento: ($F_{4, 64}$) = 0,2 $P > 0,05$), (tratamento: ($F_{1, 64}$) = 9,0 $P < 0,05$) and (interação: ($F_{4, 64}$) = 3,3 $P < 0,05$)].

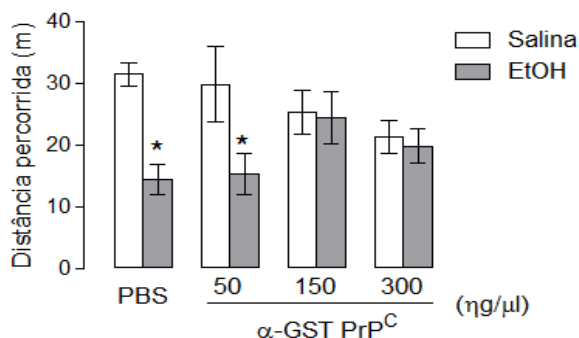


Figura 19. Avaliação dos efeitos do etanol (2 g/kg, i.p.) sobre a atividade locomotora de camundongos C57Bl/6 pré-tratados com o anticorpo anti-prion (α -GST-PrP^C) e avaliados no teste do campo aberto (10 min) * $P < 0,05$ comparado ao grupo tratado com salina. ANOVA de uma via seguida de *post-hoc* de Newman-Keuls. (n=8-10 animais por grupo).

4.6 Deleção genética da PrP^C bloqueia o desenvolvimento da tolerância rápida e aumenta a suscetibilidade aos efeitos reforçadores do etanol

O desenvolvimento da tolerância ao etanol é um importante indicador do desenvolvimento de dependência (Schuckit, 1994). Assim, utilizamos o protocolo do desenvolvimento da tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol para investigar se a deleção da PrP^C interfere nesse processo. Camundongos Prnp^{+/+} desenvolvem a tolerância rápida ao etanol, como indicado por uma maior latência de queda do rotarod no dia 2. Porém os camundongos Prnp^{0/0} não desenvolvem a tolerância rápida ao etanol (Figura 19) [(genótipo: ($F_{1, 24}$) = 45,0 $P < 0,05$), (tratamento: ($F_{1, 24}$) = 306,3 $P < 0,05$), (interação: ($F_{1, 24}$) = 7,6 $P < 0,05$), (repetição: ($F_{1, 24}$) = 238,8 $P < 0,05$), (repetição x genótipo: ($F_{1, 24}$) = 9,7 $P < 0,05$), (repetição x tratamento: ($F_{1, 24}$) = 314,4 $P < 0,05$) e (repetição x genótipo x tratamento: ($F_{1, 24}$) = 33,8 $P < 0,05$)].

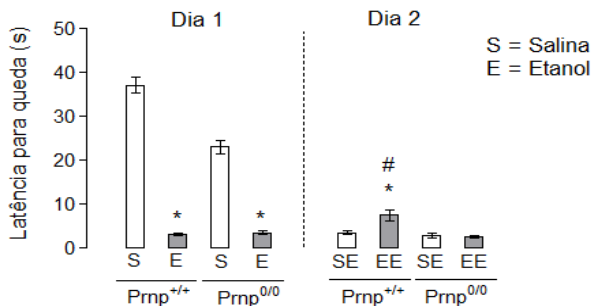


Figura 20. Avaliação da aquisição de tolerância rápida à incoordenação motora induzida pelo etanol (2,75 g/kg, i.p.) em camundongos $Prnp^{+/+}$ e $Prnp^{0/0}$ avaliados no teste do rotarod $*P<0,05$ comparado ao grupo $Prnp^{+/+}$ tratado com salina no dia 1 e $^{\#}P<0,05$ comparado ao grupo $Prnp^{0/0}$ tratado com etanol nos dois dias (EE). ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida de *post-hoc* de Newman-Keuls. (n=8-10 animais por grupo).

Os aspectos motivacionais ao etanol foram mensurados através da utilização da preferência condicionada ao lugar (PCL). Neste teste a menor concentração de etanol (0.5 g/kg, i.p.) foi capaz de induzir a PCL somente em camundongos $Prnp^{0/0}$, enquanto que uma concentração 4 vezes maior (2.0 g/kg, i.p.) foi necessária para induzir o mesmo comportamento em camundongos $Prnp^{+/+}$ (Figura 21) [(genótipo: ($F_{1, 30}$) = 0,1 $P>0,05$), (tratamento: ($F_{2, 30}$) = 2,1 $P>0,05$), (interação: ($F_{2, 30}$) = 3,1 $P>0,05$), (repetição: ($F_{1, 30}$) = 8,1 $P<0,05$), (repetição x genótipo: ($F_{1, 30}$) = 0,008 $P>0,05$), (repetição x tratamento: ($F_{2, 30}$) = 2,3 $P>0,05$) and (repetição x genótipo x tratamento: ($F_{2, 30}$) = 3,7 $P<0,05$)].

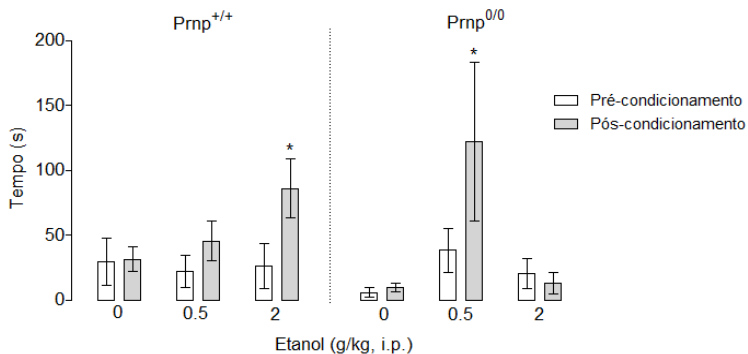


Figura 21. Avaliação do aspecto motivacional induzido pelo etanol utilizando o protocolo de PCL. * $P < 0,05$ comparado ao período de pré-condicionamento. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida de *post-hoc* de Newman-Keuls. (n=10-12 animais por grupo)

4.7 Deleção genética ou bloqueio farmacológico da PrP^C reduzem o consumo de etanol em camundongos

Utilizando um protocolo de consumo oral voluntário de etanol com concentrações crescentes, não observamos diferenças estatísticas no consumo das soluções contendo 3% ou 6% de etanol, entre os grupos Prnp^{+/+} e Prnp^{0/0}. Porém, o consumo de etanol em concentrações mais altas (10% e 20%) é reduzido em animais Prnp^{0/0} [(genótipo: ($F_{1, 17}$) = 6,0 $P < 0,05$), (repetição: ($F_{3, 51}$) = 19,7 $P < 0,05$), (interação: ($F_{3, 51}$) = 1,5 $P > 0,05$)] (Figura 22a).

Com intuito de investigar a participação dos receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ no fenótipo de consumo observado nos camundongos Prnp^{0/0}, administramos os antagonistas dopaminérgicos SCH-23390 (0,1 mg/kg, i.p.) e a sulpirida (80 mg/kg, i.p.) diariamente, por 5 dias utilizando o protocolo com solução de etanol de 10%. De maneira inesperada, os camundongos Prnp^{0/0} consumiram quantidades superiores de etanol do que os camundongos controle no primeiro dia de teste (Dia 1). O pré-tratamento com o antagonista de receptores D₁ (SCH-23390) – mas não com o antagonista dos receptores D₂ (sulpirida) – foi capaz de suprimir este consumo aumentado de etanol pelos camundongos Prnp^{0/0}. Na sequência dos dias de teste, o padrão de consumo de etanol alterou-se entre os

genótipos: no quinto dia de teste (Dia 5) os camundongos Prnp^{0/0} consumiram menos etanol em comparação com os camundongos Prnp^{+/+}, que acabaram por exibir um consumo escalar de etanol ao passar dos dias de teste. O bloqueio dos receptores D₁ ou D₂ também interrompeu o consumo escalar em camundongos Prnp^{+/+} (Figura 22b) [(genótipo: ($F_{1, 28}$) = 0,8 $P>0,05$), (tratamento: ($F_{2, 28}$) = 3,7 $P<0,05$), (interação: ($F_{2, 28}$) = 1,3 $P>0,05$), (repetição: ($F_{4, 112}$) = 4,2 $P<0,05$), (repetição x genótipo: ($F_{4, 112}$) = 6,3, $P<0,05$), (repetição x tratamento: ($F_{8, 112}$) = 3,8 $P<0,05$) e (repetição x genótipo x tratamento: ($F_{8, 112}$) = 4,5 $P<0,05$)].

O pré-tratamento com o anticorpo anti-prion (150 ng/μl, i.c.v.) também reduziu o consumo da solução de etanol (10%) (Figura 22c) [(tratamento: ($F_{1, 18}$) = 37,4 $P<0,05$), (repetição: ($F_{4, 72}$) = 3,4 $P<0,05$), (interação: ($F_{4, 72}$) = 2,1 $P>0,05$)].

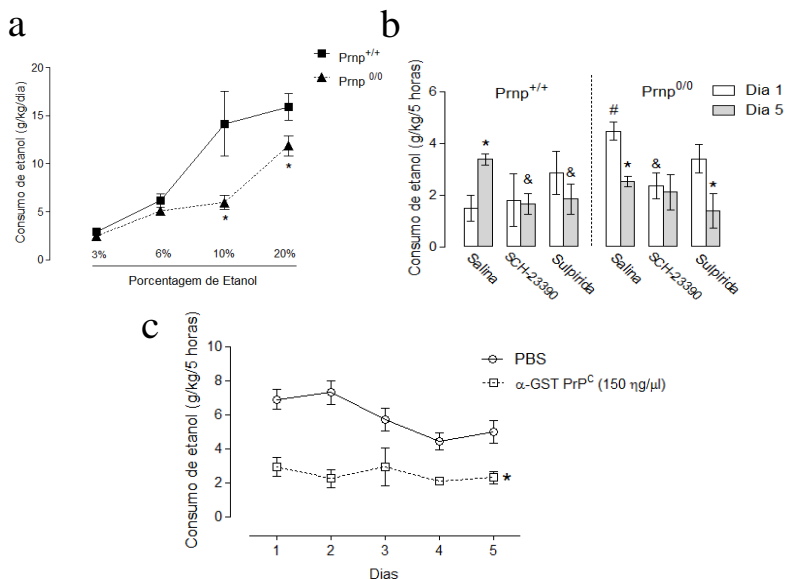


Figura 22. Avaliação do consumo de etanol em camundongos com deleção genética ou bloqueio farmacológico da PrP^C. (a) Padrão de consumo de etanol em soluções com concentrações crescentes de etanol em camundongos Prnp^{+/+} e Prnp^{0/0}. * $P < 0,05$ comparado ao consumo do grupo controle ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida do *post-hoc* de Newman-Keuls. (b) Padrão de consumo de solução de etanol 10% em camundongos Prnp^{+/+} e Prnp^{0/0} pré-tratados com antagonistas dopaminérgicos para receptores D₁ (SCH-23390) e D₂ (Sulpirida). * $P < 0,05$ comparado ao dia 1 de mesmo genótipo e tratamento. # $P < 0,05$ comparado ao dia 1 do grupo Prnp^{+/+} tratado com salina. & $P < 0,05$ comparado ao grupo salina de mesmo genótipo e mesmo dia. ANOVA de duas via com medidas repetidas seguida do *post-hoc* de Newman-Keuls (n=8-10 animais por grupo). (c) Consumo de etanol em camundongos C57Bl/6 pré-tratados diariamente com PBS ou o anticorpo anti-prion (α -GST-PrP^C). * $P < 0,05$ comparado ao consumo do grupo tratado com PBS. (n=8-10 animais por grupo). ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida do *post-hoc* de Newman-Keuls.

4.8 Camundongos nocautes para PrP^C exibem menor plasticidade do sistema dopaminérgico após a administração crônica de etanol

Tendo em vista o envolvimento do sistema dopaminérgico no consumo de etanol nos camundongos Prnp^{0/0}, resolvemos comparar as alterações causadas pela administração crônica de etanol no sistema dopaminérgico, em camundongos Prnp^{0/0} e Prnp^{+/+}. O tratamento com

etanol (2 g/kg, i.p. por 21 dias) não foi capaz de alterar os níveis de dopamina no CPF de camundongos $Prnp^{+/+}$, mas sim nos camundongos nocautes para PrP^C [(genótipo: ($F_{1,16}$) = 0,14 $P>0,05$), (tratamento: ($F_{1,16}$) = 0,8 $P>0,05$), (interação: ($F_{1,16}$) = 4,9 $P<0,05$)]. Não observamos nenhuma alteração causada pelo tratamento com etanol ou pela deleção gênica da PrP^C nos níveis de dopamina no estriado e no hipocampo (Tabela 4).

Tabela 4. Conteúdo de dopamina (DA), Serotonina e Noradrenalina em diferentes regiões cerebrais de camundongos $Prnp^{+/+}$ e $Prnp^{0/0}$ tratados repetidamente com salina ou etanol (2 g/kg, i.p. por 21 dias).

Genótipo	Tratamento	Região cerebral	DA	Serotonina	Noradrenalina
$Prnp^{+/+}$	Salina	BO	64,7±6,0	401,5±37,7	165,0±27,1
	Etanol		97,5±12,4*	434,8±57,9	195,8±24,6
$Prnp^{0/0}$	Salina	BO	36,4±17,5 [#]	482,9±24,6	161,4±16,7
	Etanol		40,4±9,2 [#]	451,6±48,4	157,5±16,6
$Prnp^{+/+}$	Salina	CPF	658,9±229,7	1341,8±120,5	454,4±26,7
	Etanol		443,7±115,6	1323,5±79,8	535,9±42,2
$Prnp^{0/0}$	Salina	CPF	233,4±102,1 [#]	1443,7±70,9	498,3±23,9
	Etanol		744,1±173,5*	1456,0±83,2	529,3±42,7
$Prnp^{+/+}$	Salina	EST	4199,0±393,7	1638,0±73,7	513,3±114,3
	Etanol		4103,7±253,6	1727,6±224,5	624,5±126,2
$Prnp^{0/0}$	Salina	EST	3674,1±119,4	1600,3±119,5	460,3±92,7
	Etanol		4463,7±126,2	1619,7±78,1	590,4±43,3
$Prnp^{+/+}$	Salina	HIP	15,4±1,9	1241,7±72,6	580,1±16,7
	Etanol		21,3±1,9	1211,1±89,6	607,4±22,3
$Prnp^{0/0}$	Salina	HIP	20,8±2,7	1409,7±45,4	590,2±14,1
	Etanol		30,3±5,3	1484,3±112,0	558,7±32,6

De acordo com estudos prévios (Vasconcelos, Macedo *et al.*, 2003), o tratamento consecutivo com etanol (2 g/kg, i.p. por 21 dias) é capaz de diminuir a densidade de receptores D_1 em camundongos. Nossos resultados indicam resultados semelhantes, como pode ser observado na Figura 23. Porém, o mesmo tratamento não foi capaz de modificar a densidade de receptores D_1 no estriado de camundongos $Prnp^{0/0}$. Novamente as alterações de densidade do receptor D_1 ocorreram em todas as sub-regiões do estriado aqui analisadas [CPu (genótipo: ($F_{1,16}$) = 3,8 $P<0,05$), (tratamento: ($F_{2,16}$) = 3,7 $P<0,05$), (interação: ($F_{2,28}$) = 3,3 $P<0,05$); CPuDm genótipo: ($F_{1,16}$) = 3,3 $P<0,05$), (tratamento: ($F_{2,16}$) = 4,7 $P<0,05$), (interação: ($F_{2,28}$) = 3,5 $P<0,05$); CPuDl genótipo: ($F_{1,16}$) = 3,9 $P<0,05$), (tratamento: ($F_{2,16}$) = 4,2 $P<0,05$), (interação: ($F_{2,28}$) = 4,5

$P<0,05$); (AccCore genótipo: ($F_{1, 16}$) = 4,3 $P<0,05$), (tratamento: ($F_{2, 16}$) = 4,7 $P<0,05$), (interação: ($F_{2, 28}$) = 3,8 $P<0,05$); (AccShell genótipo: ($F_{1, 16}$) = 5,3 $P<0,05$), (tratamento: ($F_{2, 16}$) = 6,7 $P<0,05$), (interação: ($F_{2, 28}$) = 6,5 $P<0,05$); (CPuVM genótipo: ($F_{1, 16}$) = 3,3 $P<0,05$), (tratamento: ($F_{2, 16}$) = 4,1 $P<0,05$), (interação: ($F_{2, 28}$) = 3,1 $P<0,05$); (CPuVL genótipo: ($F_{1, 16}$) = 3,9 $P<0,05$), (tratamento: ($F_{2, 16}$) = 5,7 $P<0,05$), (interação: ($F_{2, 28}$) = 5,5 $P<0,05$); (Tu genótipo: ($F_{1, 16}$) = 3,3 $P<0,05$), (tratamento: ($F_{2, 16}$) = 4,3 $P<0,05$), (interação: ($F_{2, 28}$) = 3,3 $P<0,05$). As densidades de receptores D_2 e DAT não foram alteradas pela administração de etanol em nenhuma das duas linhagens (Dados não mostrados).

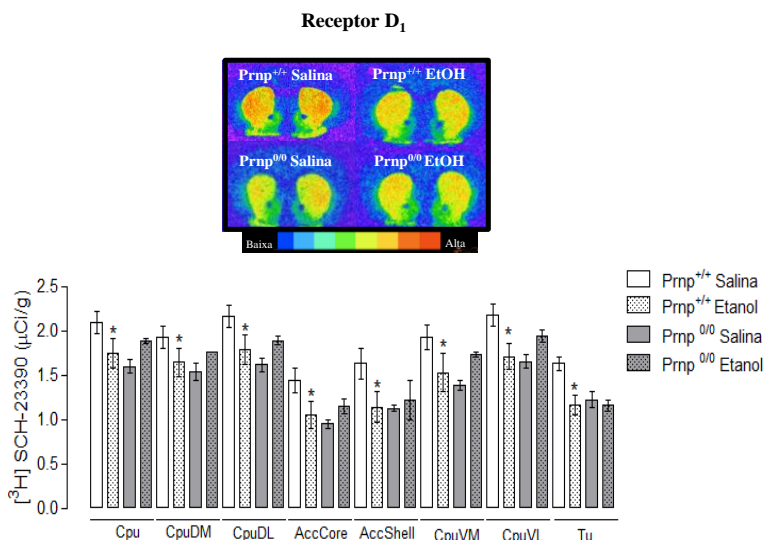


Figura 23. Avaliação da densidade de receptores D_1 em subregiões estriatais de camundongos Prnp^{+/+} e Prnp^{0/0} tratados repetidamente com salina ou etanol (2 g/kg, i.p. por 21 dias). * $P<0,05$ comparado ao mesmo genótipo e mesma subregião estriatal. ANOVA de uma via seguida de *post-hoc* de Newman-Keuls. (n= 4-5 animais).

4.9 Bloqueio da PrP^C aumenta a sensibilidade de sinapses cortico-estriatais a administração aguda de etanol

Considerando a importância dos processos de plasticidade sináptica nos processos de adição às drogas (Nestler, 2001), resolvemos investigar também este aspecto utilizando um protocolo de estimulação

cortico-estriatal. Nosso primeiro passo foi definir uma dose sub-efetiva de etanol, tanto na condição basal (tratamento: ($F_{2, 18}$) = 10,1 $P < 0,05$) (Figura 24a), quanto no processo de plasticidade sináptica (tratamento: ($F_{2, 18}$) = 8,7 $P < 0,05$) (Figura 24b-c).

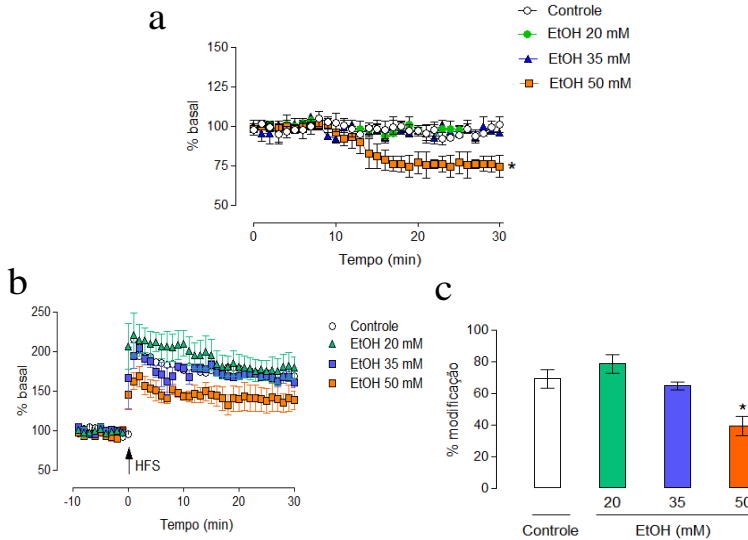


Figura 24. Avaliação dos efeitos do etanol na transmissão sináptica basal e LTP em fatias cortico-estriatais de camundongos C57Bl/6 (a) Efeito do etanol sobre a transmissão sináptica e (b e c) sobre o processo de plasticidade induzido pelo HFS. * $P < 0,05$ comparado a respostas de fatias controle qual análise usada. ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguida de *post-hoc* de Newman-Keuls. (n=4-6 animais).

Além da concentração de etanol, também definimos uma concentração sub-efetiva do anticorpo anti-prion na condição basal (Figura 25a) (tratamento: ($F_{2, 20}$) = 2,7 $P > 0,05$) e na plasticidade sináptica (Figura 25b-c) (tratamento: ($F_{2, 20}$) = 5,1 $P < 0,05$).

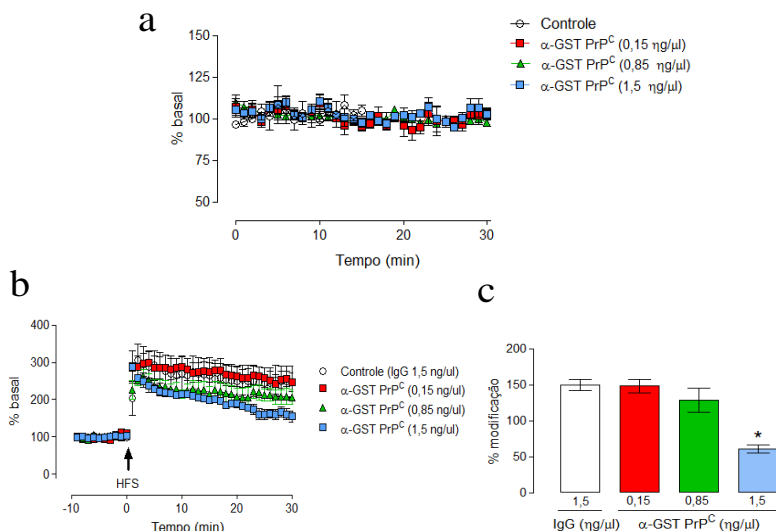


Figura 25. Avaliação dos efeitos do anticorpo anti-prion (α -GST PrP^C) na transmissão sináptica basal e LTP em fatias cortico-estriatais de camundongos C57Bl/6 (a) Efeito do α -GST PrP^C sobre a transmissão sináptica e (b e c) sobre o processo de plasticidade induzido pelo HFS. * $P < 0,05$ comparado a respostas de fatias controle. ANOVA de uma via, seguida de *post-hoc* de Newman-Keuls. (n=4-6 fatias). (n=4-6 animais).

Desta maneira, utilizando concentrações sub-efetivas das duas substâncias (etanol e o anticorpo anti-prion), pudemos verificar o efeito sinérgico do bloqueio da PrP^C com os efeitos do etanol. Os resultados demonstraram que o pré-tratamento com o α -GST-PrP^C promoveu a diminuição da atividade sináptica após a adição de uma dose sub-efetiva de etanol (tratamento: ($F_{2, 21}$) = 3,7 $P < 0,05$) (Figura 26a). E ainda mais relevante para as respostas de sensibilização ao etanol, a amplitude da LTP foi também diminuída na presença do etanol após o pré-tratamento com o anticorpo anti-prion (α -GST-PrP^C) (Figura 26b-c) (tratamento: ($F_{2, 21}$) = 4,4 $P < 0,05$).

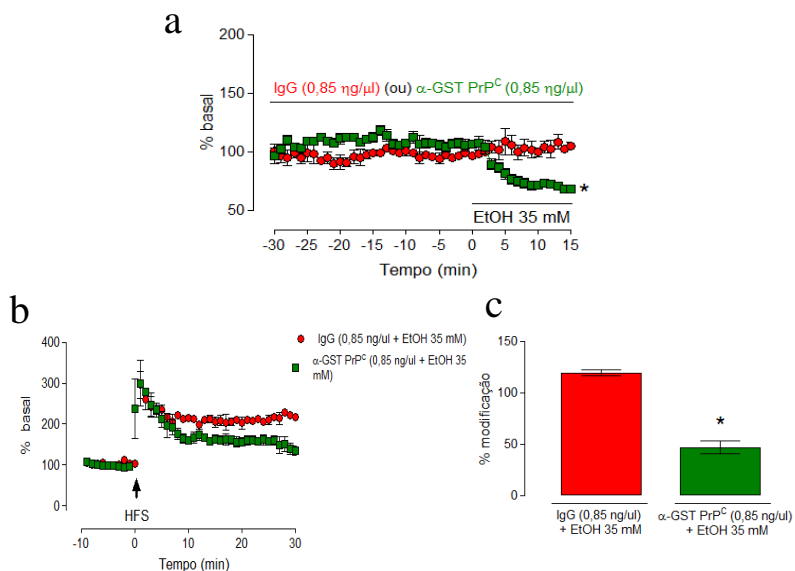


Figura 26. Avaliação do efeito sinérgico entre o etanol e o anticorpo anti-prion (α -GST PrP^C) na transmissão sináptica basal (a) e (b e c) na LTP em fatias cortico-estriatais de camundongos C57Bl/6. $*P < 0,05$ comparado a respostas de fatias controle. ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguida de *post-hoc* de Newman-Keuls. (n=4-6 animais).

5. DISCUSSÃO

O papel da PrP^C nos processos de plasticidade do SNC já foi demonstrado previamente (Collinge, Whittington *et al.*, 1994; Khosravani, Zhang, Tsutsui *et al.*, 2008). Então, seria razoável hipotetizar que a PrP^C poderia influenciar no estabelecimento da adição às drogas, sendo este um processo onde ocorrem alterações funcionais e estruturais profundas (Kauer e Malenka, 2007). O presente estudo demonstra de maneira inédita que o bloqueio farmacológico ou deleção genética da PrP^C interfere com os efeitos do etanol em camundongos, através de alterações no sistema dopaminérgico. Como citado anteriormente, o sistema dopaminérgico é um dos sistemas de neurotransmissão mais importantes na adição às drogas, sendo pela interferência direta no sistema dopaminérgico que a PrP^C afeta o estabelecimento da tolerância e outras características da adição (como o consumo oral voluntário, e a motivação).

A observação do aumento do comportamento de escalada espontâneo nos camundongos Prnp^{0/0} foi nossa primeira pista, motivando assim, um estudo mais detalhado sobre as alterações do sistema dopaminérgico causados pela deleção da PrP^C. O comportamento de escalada depende da ativação concomitante dos receptores dopaminérgicos D₁ e D₂, sendo que o bloqueio independente de um destes sub-tipos de receptores já é suficiente para abolir esta resposta (Fetsko, Xu *et al.*, 2003). Tentamos, ainda que sem sucesso, induzir o comportamento de escalada bloqueando farmacologicamente a PrP^C. Uma hipótese que explica este resultado seria a de que o bloqueio agudo da PrP^C, difere da deleção gênica, no caso das duas linhagens de camundongos nocautes, imaginando-se que a perda de função da PrP^C causada nestes animais é temporalmente muito maior, e esteve presente em períodos seminais para maturação do SNC (como a adolescência). Devemos ainda considerar o próprio papel da PrP^C no desenvolvimento, especialmente no processo de maturação e diferenciação neuronal como descrito previamente (Bribian, Fontana *et al.*, 2012).

Apesar de o estriado ser uma estrutura chave na mediação do comportamento de escalada (Protais, Costentin *et al.*, 1976), não encontramos nenhuma alteração nos níveis de dopamina nesta estrutura cerebral. Em contrapartida, camundongos Prnp^{0/0} apresentaram uma diminuição na densidade de receptores D₁ (mas não D₂ ou DAT) no estriado, sugerindo que a PrP^C tem papel importante na transmissão dopaminérgica nesta estrutura cerebral, através da regulação da densidade de receptores dopaminérgicos, ao invés da regulação dos níveis de DA.

Os efeitos do etanol sobre a atividade locomotora em roedores também ocorrem via modificações da função dopaminérgica (Mathews, Brookshire *et al.*, 2009). Nossos resultados indicam que o tratamento, tanto

agudo quanto crônico, com etanol aumentou a resposta locomotora em camundongos $Prnp^{0/0}$, sugerindo a participação da PrP^C nos efeitos euforigênicos com aumento da atividade locomotora provocados pelo etanol. Estes efeitos euforigênicos do etanol e sua relação com a locomoção também são observados em humanos, onde tanto a administração aguda de baixas doses provoca euforia, mas também potencializa os efeitos excitatórios em combinação com outras drogas como a cocaína (Kirkpatrick, Gunderson *et al.*, 2011). Ainda, a administração de baixas doses de etanol em camundongos também produz o mesmo efeito de aumento da locomoção em administrações agudas ou potencializando efeitos da anfetamina (Griffin, Novak *et al.*, 2010).

Este aumento da atividade locomotora em camundongos $Prnp^{0/0}$ tratados com etanol manteve-se por 21 dias de tratamento repetido. É importante ressaltar que é improvável que estas alterações comportamentais observadas, estejam relacionadas a diferenças farmacocinéticas e efeitos inespecíficos não relacionados ao SNC, visto que monitoramos possíveis diferenças na metabolização do etanol (pela mensuração de etanol no sangue), pela verificação histológica dos fígados dos camundongos além de acompanharmos a massa corpórea dos animais ao longo do tratamento, sendo que não foram observadas diferenças de genótipo nestes parâmetros. Observamos ainda que o bloqueio farmacológico agudo da PrP^C no SNC previniu a redução da atividade locomotora observada em camundongos C57Bl/6 após uma única administração de etanol. A resposta de redução da atividade locomotora após administração de etanol (na mesma concentração que utilizamos 2 g/kg i.p) em animais C57Bl/6 já havia sido demonstrada numa comparação entre diversas linhagens de camundongos, sendo estes os mais sensíveis aos efeitos do etanol (Mathews, Brookshire *et al.*, 2009). De maneira geral, estes resultados levantam dois pontos importantes: 1) há uma influência aguda da PrP^C sobre os efeitos do etanol que transcendem neste caso, alterações no desenvolvimento de animais nocautes para PrP^C ; e 2) talvez haja um impacto direto da modulação da PrP^C sobre os efeitos do etanol, de forma adicional a provável influência sobre as alterações dopaminérgicas, como descrevemos anteriormente.

Seguindo estes achados iniciais indicando a capacidade da PrP^C em modular os processos de neuroplasticidade induzidos pelo etanol, submetemos os camundongos $Prnp^{+/+}$ e $Prnp^{0/0}$ ao protocolo de tolerância rápida, investigando assim a possível influência da deleção genética da PrP^C nos processos de neuroadaptação ao etanol. A aquisição da tolerância rápida depende de mecanismos neuroadaptativos como a síntese proteica (Bitran e Kalant, 1993) e a presença de receptores dopaminérgicos D_1 e mecanismos associados a este receptor, como a ativação da DARPP-32 (Kalant, 1998). Além disso, o processo de tolerância ao etanol contribui para o consumo voluntário de etanol sendo um indicativo de aumento na suscetibilidade ao

alcoholismo (Kalant, 1998). A deleção genética da PrP^C previniu o desenvolvimento da tolerância rápida em animais testados no rotarod. Então considerando a natureza do processo de tolerância (Moonat, Starkman *et al.*, 2009), a ausência da PrP^C mantém a magnitude dos efeitos centrais do etanol sustentada por períodos prolongados após administração repetida, ou como a própria PrP^C controla processos de síntese proteica (Roffe, Beraldo *et al.*, 2010) talvez a etapa de aquisição da tolerância não se estabeleça em camundongos que não expressam esta proteína. Além disso, o resultado obtido no teste da tolerância rápida está de acordo com a diminuição da densidade de receptores D₁ e da expressão da DARPP-32 como citado acima.

A ausência de tolerância também interfere no consumo voluntário do etanol. Quando alterações de adaptação ao etanol (como no caso da tolerância) acontecem de maneira normal, subsequentemente espera-se um aumento no consumo de etanol, tipicamente observado em humanos. Confirmamos esta afirmação utilizando o teste de Consumo oral voluntário oral de etanol com concentrações crescentes. Quando testamos o consumo de soluções com baixas concentrações de etanol (3% e 6%), ambos os genótipos consumiram quantidades semelhantes de etanol; porém camundongos Prnp^{0/0} consumiram menores quantidades de concentrações mais elevadas de etanol (10% e 20%) em comparação com os camundongos Prnp^{+/+}. O bloqueio farmacológico da PrP^C confirmou estes resultados, também revelando um consumo reduzido da solução de etanol 10% quando animais C57Bl/6 foram previamente tratados com o anticorpo anti-prion (α -GST-PrP^C). De maneira inesperada e curiosa, quando avaliamos temporalmente o perfil de consumo da solução de 10% de etanol, os camundongos Prnp^{0/0} na verdade consumiram mais etanol que os controles (Prnp^{+/+}) no primeiro dia, mas este padrão foi revertido com o passar dos dias. Esta observação indica que: 1) alterações do sistema dopaminérgico nos camundongos Prnp^{0/0} confere maior sensibilidade ao etanol (dia 1); e 2) a falta de adaptação apropriada aos efeitos do etanol (como a falta de tolerância) talvez levem estes animais a reduzir o consumo de etanol com o passar dos dias. O envolvimento chave das modificações do sistema dopaminérgico neste controle do consumo de etanol mediado pela PrP^C, foi ainda confirmado pelo impacto da administração de antagonistas dopaminérgicos sobre o consumo de etanol em camundongos nocautes comparados com os controles. O pré-tratamento com antagonistas D₁ e D₂ bloquearam o padrão de consumo escalar de etanol em camundongos Prnp^{+/+}. Em contraste, somente o antagonismo do receptor D₁ alterou o perfil do consumo de etanol (especialmente no dia 1), indicando o papel fundamental deste receptor nas alterações agudas ao etanol em camundongos Prnp^{0/0}.

Os níveis de dopamina após a administração aguda de etanol tendem a aumentar, porém com o contato repetido, respostas neuroadaptativas de sensibilização fazem com que esses níveis de dopamina não aumentem mais ao etanol (Ding, Rodd *et al.*, 2009). De maneira contrária, em relação à densidade de receptores dopaminérgicos D_1 , o contato repetido ao etanol promove uma diminuição destes receptores, também esta sendo uma resposta adaptativa e com relação próxima a tolerância (Vasconcelos, Macedo *et al.*, 2003; Philibin, Hernandez *et al.*, 2011).

Com estas alterações adaptativas em mente, resolvemos avaliar as respostas neuroquímicas do metabolismo da DA e a densidade de receptores em resposta ao tratamento repetido com etanol nos animais $Prnp^{+/+}$ e $Prnp^{0/0}$. Níveis aumentados de DA foram observados no CPF de camundongos $Prnp^{0/0}$, mas não nos $Prnp^{+/+}$, após 21 dias de tratamento consecutivo com etanol, enquanto que não observamos alterações nos níveis de DA no estriado de nenhum dos genótipos. A falta de alteração nos níveis de DA nos camundongos $Prnp^{+/+}$ era esperada pela capacidade que camundongos “normais” têm de se adaptar a exposição ao etanol, assumindo um estado alostático (Koob, 2003). Por outro lado, e como já mostrado no experimento de tolerância rápida, os camundongos $Prnp^{0/0}$ não tem a mesma capacidade de ativar mecanismos de plasticidade neuronal e de se adaptarem à exposição ao etanol, e desta forma não estabelecem um balanço alostático, pelo menos no período de nossas análises. Esta observação está de acordo com nossos resultados de autorradiografia. Após 21 dias de tratamento consecutivo de etanol, o grupo controle ($Prnp^{+/+}$) apresentou diminuição da densidade de receptores D_1 no estriado, mas a densidade dos mesmos receptores permaneceu semelhante no grupo de mesmo genótipo, mas tratado com salina. Este resultado está de acordo com a descrição prévia deste processo de adaptação causado pelo contato prolongado com o etanol em humanos (Volkow, Fowler *et al.*, 2003) e roedores (Moonat, Starkman *et al.*, 2009). O mesmo tratamento repetido com etanol não alterou a densidade de receptores D_1 em camundongos $Prnp^{0/0}$. De maneira geral, estes achados demonstram que as adaptações do sistema dopaminérgico causadas pelo etanol, são dependentes da presença da PrP^C .

Como o aspecto motivacional é um elemento chave na adição ao etanol (Tzschenke, 2007), avaliamos os camundongos $Prnp^{+/+}$ e $Prnp^{0/0}$ no protocolo da PCL. Confirmando nossos achados de aumento de sensibilidade ao etanol em camundongos $Prnp^{0/0}$, estes animais desenvolveram a PCL em uma concentração baixa de etanol (0,5 g/kg/i.p.), enquanto que camundongos $Prnp^{+/+}$ desenvolveram a PCL somente na maior concentração testada (2 g/kg/i.p). Estes resultados reforçam a diferença de impacto do etanol nos camundongos $Prnp^{0/0}$. O CPF e o EST foram previamente descritos como regiões cerebrais importantes para a

aquisição da PCL (Tzschentke, 2007), e neste trabalho demonstramos alterações dopaminérgicas importantes (concentração de dopamina no CPF e densidade de receptores D₁ no EST) nestas duas regiões cerebrais. Sugerimos que a alteração na variação dos efeitos bifásicos do etanol (euforia/disforia) podem ser fundamentalmente dependentes de alterações dopaminérgicas no CPF e EST, estruturas com alta expressão da PrP^C.

Esta nova hipótese dopaminérgica de interpretar o impacto da PrP^C nos efeitos centrais do etanol não exclui a possibilidade de que a PrP^C possa também controlar os efeitos do etanol em sinapses glutamatérgicas, como proposto recentemente em sinapses hipocâmpais (Petit-Paitel, Menard *et al.*, 2012). Apesar de a sensibilização às drogas psicoativas estar sendo reconhecida como resultado de alterações adaptativas em sinapses glutamatérgicas, seria mais lógico que estas fossem moduladas no estriado e não no hipocampo (Nestler, 2001). De acordo com nossa hipótese de que o bloqueio farmacológico da PrP^C altera a sensibilização ao etanol, resolvemos investigar se a PrP^C controla a transmissão e a plasticidade glutamatérgica em sinapses cortico-estriatais. Observamos que o bloqueio farmacológico agudo da PrP^C em uma preparação *in vitro*, permite a uma concentração sub-efetiva de etanol induzir a depressão da transmissão sináptica. Este resultado está de acordo com as conclusões derivadas do teste do campo aberto e da PCL, onde o bloqueio da PrP^C afeta a resposta euforia/disforia ao efeito agudo do etanol. As observações combinadas de que a manipulação da PrP^C afeta simultaneamente os processos de plasticidade em sinapses cortico-estriatais e a expressão de um efector intracelular chave em neurônios espinais médios, a DARPP-32 (Svenningsson *et al.*, 2004), sugere um link entre os efeitos da PrP^C sobre os sistemas glutamatérgicos e dopaminérgicos.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho demonstramos o envolvimento da PrP^C nos efeitos do etanol em camundongos e que a manipulações genética e farmacológica desta proteína alteram indicadores comportamentais e neuroquímicos da adição ao etanol. A falta de adaptação comportamental observada em camundongos Prnp^{0/0} confirma a importância desta proteína na neuroplasticidade. Evidências obtidas no presente estudo sugerem que a PrP^C influencia o balanço da transmissão sináptica em algumas áreas cerebrais sabidamente envolvidas com o processo de adição às drogas, contribuindo para certa resiliência aos efeitos do etanol. De forma geral, os resultados do presente estudo indicam que a PrP^C é fundamental para a transmissão dopaminérgica na via mesocorticolímbica, levando ao controle adaptativo da densidade dos receptores dopaminérgicos D₁. Desta maneira, sugerimos a possibilidade da PrP^C ser um novo alvo terapêutico para o

alcoolismo. Como esta manipulação afeta os efeitos de outras drogas com potencial aditivo é ainda uma questão em aberto que certamente merece futuras investigações.

REFERÊNCIAS

Adermark, L., R. B. Clarke, *et al.* Ethanol-induced modulation of synaptic output from the dorsolateral striatum in rat is regulated by cholinergic interneurons. Neurochem Int, v.58, n.6, May, p.693-9. 2011.

Adermark, L. e D. M. Lovinger. Ethanol effects on electrophysiological properties of astrocytes in striatal brain slices. Neuropharmacology, v.51, n.7-8, Dec, p.1099-108. 2006.

Aguzzi, A. Prion diseases of humans and farm animals: epidemiology, genetics, and pathogenesis. J Neurochem, v.97, n.6, Jun, p.1726-39. 2006.

Aguzzi, A. e A. M. Calella. Prions: protein aggregation and infectious diseases. Physiol Rev, v.89, n.4, Oct, p.1105-52. 2009.

Aguzzi, A. e C. Haass. Games played by rogue proteins in prion disorders and Alzheimer's disease. Science, v.302, n.5646, Oct 31, p.814-8. 2003.

Aizman, O., H. Brismar, *et al.* Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons. Nat Neurosci, v.3, n.3, Mar, p.226-30. 2000.

Almeida, O. F., M. Shoaib, *et al.* Gender differences in ethanol preference and ingestion in rats. The role of the gonadal steroid environment. J Clin Invest, v.101, n.12, Jun 15, p.2677-85. 1998.

Alper, T. The nature of the scrapie agent. J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol), v.6, p.154-5. 1972.

Alper, T., W. A. Cramp, *et al.* Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? Nature, v.214, n.5090, May 20, p.764-6. 1967.

Alper, T., D. A. Haig, *et al.* The exceptionally small size of the scrapie agent. Biochem Biophys Res Commun, v.22, n.3, Feb 3, p.278-84. 1966.

Altman, J., B. J. Everitt, *et al.* The biological, social and clinical bases of drug addiction: commentary and debate. Psychopharmacology (Berl), v.125, n.4, Jun, p.285-345. 1996.

Angot, E., J. A. Steiner, *et al.* Are synucleinopathies prion-like disorders? Lancet Neurol, v.9, n.11, Nov, p.1128-38. 2010.

Arnt, J., J. Hyttel, *et al.* Dopamine D-1 receptor agonists combined with the selective D-2 agonist quinpirole facilitate the expression of oral stereotyped behaviour in rats. Eur J Pharmacol, v.133, n.2, Jan 13, p.137-45. 1987.

Bare, D. J., J. H. Mckinzie, *et al.* Development of rapid tolerance to ethanol-stimulated serotonin release in the ventral hippocampus. Alcohol Clin Exp Res, v.22, n.6, Sep, p.1272-6. 1998.

Berke, J. D. e S. E. Hyman. Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. Neuron, v.25, n.3, Mar, p.515-32. 2000.

Berridge, K. C. Espresso reward learning, hold the dopamine: theoretical comment on Robinson et al. (2005). Behav Neurosci, v.119, n.1, Feb, p.336-41. 2005.

Bianchin, M. M., R. Walz, *et al.* Dilated cardiomyopathy and Creutzfeldt-Jakob disease: evidence for a role of cellular prion protein in the heart? Arch Intern Med, v.165, n.14, Jul 25, p.1663-4. 2005.

Bitran, M. e H. Kalant. Effect of anisomycin on the development of rapid tolerance to ethanol-induced motor impairment. Pharmacol Biochem Behav, v.45, n.1, May, p.225-8. 1993.

Bordi, F., K. D. Carr, *et al.* Stereotypies elicited by injection of N-propylnorapomorphine into striatal subregions and nucleus accumbens. Brain Res, v.489, n.2, Jun 12, p.205-15. 1989.

Braun, A. R., M. Laruelle, *et al.* Interactions between D1 and D2 dopamine receptor family agonists and antagonists: the effects of chronic exposure on behavior and receptor binding in rats and their clinical implications. J Neural Transm, v.104, n.4-5, p.341-62. 1997.

Bribian, A., X. Fontana, *et al.* Role of the cellular prion protein in oligodendrocyte precursor cell proliferation and differentiation in the developing and adult mouse CNS. PLoS One, v.7, n.4, p.e33872. 2012.

Brodie, M. S., S. A. Shefner, *et al.* Ethanol increases the firing rate of dopamine neurons of the rat ventral tegmental area in vitro. Brain Res., v.508, n.1, Jan 29, p.65-9. 1990.

Brown, D. R., K. Qin, *et al.* The cellular prion protein binds copper in vivo. Nature, v.390, n.6661, Dec 18-25, p.684-7. 1997.

Brown, D. R., W. J. Schulz-Schaeffer, *et al.* Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. Exp Neurol, v.146, n.1, Jul, p.104-12. 1997.

Brown, D. R., B. S. Wong, *et al.* Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. Biochem J, v.344 Pt 1, Nov 15, p.1-5. 1999.

Budygin, E. A., P. E. Phillips, *et al.* Effect of acute ethanol on striatal dopamine neurotransmission in ambulatory rats. J Pharmacol Exp Ther, v.297, n.1, Apr, p.27-34. 2001.

Bueler, H., A. Aguzzi, *et al.* Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. Cell, v.73, n.7, Jul 2, p.1339-47. 1993.

Bueler, H., M. Fischer, *et al.* Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. Nature, v.356, n.6370, Apr 16, p.577-82. 1992.

Bueler, H., A. Raeber, *et al.* High prion and PrPSc levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. Mol Med, v.1, n.1, Nov, p.19-30. 1994.

Busto, U. E. Pharmacogenetics of alcohol: treatment implications. Alcohol Clin Exp Res, v.24, n.9, Sep, p.1323-6. 2000.

Cabral, A. L., K. S. Lee, *et al.* Regulation of the cellular prion protein gene expression depends on chromatin conformation. J Biol Chem, v.277, n.7, Feb 15, p.5675-82. 2002.

Cailhol, S. e P. Mormede. Conditioned taste aversion and alcohol drinking: strain and gender differences. J Stud Alcohol, v.63, n.1, Jan, p.91-9. 2002.

Cami, J. e M. Farre. Drug addiction. N Engl J Med, v.349, n.10, Sep 4, p.975-86. 2003.

- Campbell, U. C., J. S. Rodefer, *et al.* Effects of dopamine receptor antagonists (D1 and D2) on the demand for smoked cocaine base in rhesus monkeys. Psychopharmacology (Berl), v.144, n.4, Jun, p.381-8. 1999.
- Carlsson, A. Detection and assay of dopamine. Pharmacol Rev, v.11, n.2, Part 2, Jun, p.300-4. 1959.
- Carlsson, A., M. Lindqvist, *et al.* 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. Nature, v.180, n.4596, Nov 30, p.1200. 1957.
- Carlsson, A. e B. Waldeck. A fluorimetric method for the determination of dopamine (3-hydroxytyramine). Acta Physiol Scand, v.44, n.3-4, Dec 15, p.293-8. 1958.
- Cheer, J. F., B. J. Aragona, *et al.* Coordinated accumbal dopamine release and neural activity drive goal-directed behavior. Neuron, v.54, n.2, Apr 19, p.237-44. 2007.
- Chen, S., A. Mange, *et al.* Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. Mol Cell Neurosci, v.22, n.2, Feb, p.227-33. 2003.
- Chesebro, B., R. Race, *et al.* Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. Nature, v.315, n.6017, May 23-29, p.331-3. 1985.
- Chiarini, L. B., A. R. Freitas, *et al.* Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. Embo J, v.21, n.13, Jul 1, p.3317-26. 2002.
- Coitinho, A. S., M. O. Dietrich, *et al.* Decreased hyperlocomotion induced by MK-801, but not amphetamine and caffeine in mice lacking cellular prion protein (PrP(C)). Brain Res Mol Brain Res, v.107, n.2, Nov 15, p.190-4. 2002.
- Coitinho, A. S., A. R. Freitas, *et al.* The interaction between prion protein and laminin modulates memory consolidation. Eur J Neurosci, v.24, n.11, Dec, p.3255-64. 2006.
- Colling, S. B., J. Collinge, *et al.* Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+)-activated K⁺ currents. Neurosci Lett, v.209, n.1, May 3, p.49-52. 1996.

Colling, S. B., M. Khana, *et al.* Mossy fibre reorganization in the hippocampus of prion protein null mice. Brain Res, v.755, n.1, Apr 25, p.28-35. 1997.

Collinge, J., M. A. Whittington, *et al.* Prion protein is necessary for normal synaptic function. Nature, v.370, n.6487, Jul 28, p.295-7. 1994.

Criado, J. R., M. Sanchez-Alavez, *et al.* Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. Neurobiol Dis, v.19, n.1-2, Jun-Jul, p.255-65. 2005.

Croucher, M. J., B. S. Meldrum, *et al.* Anticonvulsant activity of GABA uptake inhibitors and their prodrugs following central or systemic administration. Eur J Pharmacol, v.89, n.3-4, May 6, p.217-28. 1983.

Ding, Z. M., Z. A. Rodd, *et al.* Sensitization of ventral tegmental area dopamine neurons to the stimulating effects of ethanol. Alcohol Clin Exp Res, v.33, n.9, Sep, p.1571-81. 2009.

Dombrowski, P. A., M. C. Carvalho, *et al.* Microdialysis study of striatal dopamine in MPTP-hemilesioned rats challenged with apomorphine and amphetamine. Behav Brain Res, v.215, n.1, Dec 20, p.63-70. 2010.

El-Ghundi, M., S. R. George, *et al.* Disruption of dopamine D1 receptor gene expression attenuates alcohol-seeking behavior. Eur J Pharmacol, v.353, n.2-3, Jul 24, p.149-58. 1998.

Ellis, V., M. Daniels, *et al.* Plasminogen activation is stimulated by prion protein and regulated in a copper-dependent manner. Biochemistry, v.41, n.22, Jun 4, p.6891-6. 2002.

Ericson, M., A. Molander, *et al.* Ethanol elevates accumbal dopamine levels via indirect activation of ventral tegmental nicotinic acetylcholine receptors. Eur J Pharmacol, v.467, n.1-3, Apr 25, p.85-93. 2003.

Fath, T., Y. D. Ke, *et al.* Primary support cultures of hippocampal and substantia nigra neurons. Nat Protoc, v.4, n.1, p.78-85. 2009.

Ferrer, I., R. Blanco, *et al.* Prion protein expression in senile plaques in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol, v.101, n.1, Jan, p.49-56. 2001.

Fetsko, L. A., R. Xu, *et al.* Alterations in D1/D2 synergism may account for enhanced stereotypy and reduced climbing in mice lacking dopamine D2L receptor. Brain Res., v.967, n.1-2, Mar 28, p.191-200. 2003.

Fleming, R. L., S. K. Acheson, *et al.* GABA transport modulates the ethanol sensitivity of tonic inhibition in the rat dentate gyrus. Alcohol, v.45, n.6, Sep, p.577-83.

_____. GABA transport modulates the ethanol sensitivity of tonic inhibition in the rat dentate gyrus. Alcohol, v.45, n.6, Sep, p.577-83. 2011.

Ford, M. J., L. J. Burton, *et al.* A marked disparity between the expression of prion protein and its message by neurones of the CNS. Neuroscience, v.111, n.3, p.533-51. 2002.

Gajdusek, D. C. Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. Science, v.197, n.4307, Sep 2, p.943-60. 1977.

Gajdusek, D. C., C. J. Gibbs, Jr., *et al.* Transmission and passage of experimental "kuru" to chimpanzees. Science, v.155, n.3759, Jan 13, p.212-4. 1967.

Gauczynski, S., J. M. Peyrin, *et al.* The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. Embo J., v.20, n.21, Nov 1, p.5863-75. 2001.

Gerfen, C. R., J. F. Mcginty, *et al.* Dopamine differentially regulates dynorphin, substance P, and enkephalin expression in striatal neurons: in situ hybridization histochemical analysis. J Neurosci, v.11, n.4, Apr, p.1016-31. 1991.

Gonzalez-Iglesias, R., M. A. Pajares, *et al.* Prion protein interaction with glycosaminoglycan occurs with the formation of oligomeric complexes stabilized by Cu(II) bridges. J Mol Biol, v.319, n.2, May 31, p.527-40. 2002.

Griffin, W. C., 3rd, A. J. Novak, *et al.* The interactive effects of methylphenidate and ethanol on ethanol consumption and locomotor activity in mice. Pharmacol Biochem Behav, v.95, n.3, May, p.267-72. 2010.

Griffith, J. S. Self-replication and scrapie. Nature, v.215, n.5105, Sep 2, p.1043-4. 1967.

Hainfellner, J. A., J. Wanschitz, *et al.* Coexistence of Alzheimer-type neuropathology in Creutzfeldt-Jakob disease. Acta Neuropathol, v.96, n.2, Aug, p.116-22. 1998.

Haley, T. J. e W. G. McCormick. Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse. Br J Pharmacol Chemother, v.12, n.1, Mar, p.12-5. 1957.

Hermes, J. W., S. Korte, *et al.* Altered intracellular calcium homeostasis in cerebellar granule cells of prion protein-deficient mice. J Neurochem, v.75, n.4, Oct, p.1487-92. 2000.

Hubner, C. B. e G. F. Koob. The ventral pallidum plays a role in mediating cocaine and heroin self-administration in the rat. Brain Res, v.508, n.1, Jan 29, p.20-9. 1990.

Joseph, J. D., Y. M. Wang, *et al.* Dopamine autoreceptor regulation of release and uptake in mouse brain slices in the absence of D(3) receptors. Neuroscience, v.112, n.1, p.39-49. 2002.

Kalant, H. Research on tolerance: what can we learn from history? Alcohol Clin Exp Res, v.22, n.1, Feb, p.67-76. 1998.

Kalivas, P. W. Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area. Brain Res Brain Res Rev, v.18, n.1, Jan-Apr, p.75-113. 1993.

Kalivas, P. W., N. Volkow, *et al.* Unmanageable motivation in addiction: a pathology in prefrontal-accumbens glutamate transmission. Neuron, v.45, n.5, Mar 3, p.647-50. 2005.

Kapadia, F., J. A. Cook, *et al.* The relationship between non-injection drug use behaviors on progression to AIDS and death in a cohort of HIV seropositive women in the era of highly active antiretroviral therapy use. Addiction, v.100, n.7, Jul, p.990-1002. 2005.

Kauer, J. A. e R. C. Malenka. Synaptic plasticity and addiction. Nat Rev Neurosci, v.8, n.11, Nov, p.844-58. 2007.

Keshet, G. I., O. Bar-Peled, *et al.* The cellular prion protein colocalizes with the dystroglycan complex in the brain. J Neurochem, v.75, n.5, Nov, p.1889-97. 2000.

Khosravani, H., Y. Zhang, *et al.* Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. J Cell Biol, v.181, n.3, May 5, p.551-65. 2008.

_____. Cellular prion protein null mice display normal AMPA receptor mediated long term depression. Prion, v.2, n.2, Apr-Jun, p.48-50. 2008.

Kirkpatrick, M. G., E. W. Gunderson, *et al.* Acute and residual interactive effects of repeated administrations of oral methamphetamine and alcohol in humans. Psychopharmacology (Berl), v.219, n.1, Jan, p.191-204. 2011.

Koob, G. F. Alcoholism: allostasis and beyond. Alcohol Clin Exp Res, v.27, n.2, Feb, p.232-43. 2003.

Koob, G. F. e F. E. Bloom. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. Science, v.242, n.4879, Nov 4, p.715-23. 1988.

Koob, G. F. e F. Weiss. Pharmacology of drug self-administration. Alcohol, v.7, n.3, May-Jun, p.193-7. 1990.

Koyama, S., M. S. Brodie, *et al.* Ethanol inhibition of m-current and ethanol-induced direct excitation of ventral tegmental area dopamine neurons. J Neurophysiol, v.97, n.3, Mar, p.1977-85. 2007.

Kuschinsky, K. On the effects of apomorphine in mammals and frogs. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, v.373, n.6, Sep, p.387-9. 2006.

Langen, M., M. J. Kas, *et al.* The neurobiology of repetitive behavior: of mice. Neurosci Biobehav Rev, v.35, n.3, Jan, p.345-55. 2010.

Laranjeira, R. P., I.; Zaleski, M.; Caetano, R. Levantamento Nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira. SENAD. I: 40 p. 2007.

Lee, C. R., E. D. Abercrombie, *et al.* Pallidal control of substantia nigra dopaminergic neuron firing pattern and its relation to extracellular neostriatal dopamine levels. Neuroscience, v.129, n.2, p.481-9. 2004.

Leucht, C., S. Simoneau, *et al.* The 37 kDa/67 kDa laminin receptor is required for PrP(Sc) propagation in scrapie-infected neuronal cells. EMBO Rep, v.4, n.3, Mar, p.290-5. 2003.

Linden, R., V. R. Martins, *et al.* Physiology of the prion protein. Physiol Rev, v.88, n.2, Apr, p.673-728. 2008.

Lobao-Soares, B., R. Walz, *et al.* Cellular prion protein regulates the motor behaviour performance and anxiety-induced responses in genetically modified mice. Behav Brain Res, v.183, n.1, Oct 1, p.87-94. 2007.

Lopes, M. H., G. N. Hajj, *et al.* Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. J Neurosci, v.25, n.49, Dec 7, p.11330-9. 2005.

Lovinger, D. M. Interactions between ethanol and agents that act on the NMDA-type glutamate receptor. Alcohol Clin Exp Res, v.20, n.8 Suppl, Nov, p.187A-191A. 1996.

_____. Mixing proteomics and alcohol. Alcohol, v.40, n.1, Aug, p.1-2. 2006.

Lovinger, D. M. e M. Roberto. Synaptic effects induced by alcohol. Curr Top Behav Neurosci, v.13, p.31-86.

Maglio, L. E., V. R. Martins, *et al.* Role of cellular prion protein on LTP expression in aged mice. Brain Res, v.1097, n.1, Jun 30, p.11-8. 2006.

Maldve, R. E., T. A. Zhang, *et al.* DARPP-32 and regulation of the ethanol sensitivity of NMDA receptors in the nucleus accumbens. Nat Neurosci, v.5, n.7, Jul, p.641-8. 2002.

Malenka, R. C. e M. F. Bear. LTP and LTD: an embarrassment of riches. Neuron, v.44, n.1, Sep 30, p.5-21. 2004.

Mallucci, G. e J. Collinge. Rational targeting for prion therapeutics. Nat Rev Neurosci, v.6, n.1, Jan, p.23-34. 2005.

Manson, J. C., A. R. Clarke, *et al.* 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. Mol Neurobiol, v.8, n.2-3, Apr-Jun, p.121-7. 1994.

_____. PrP gene dosage determines the timing but not the final intensity or distribution of lesions in scrapie pathology. Neurodegeneration, v.3, n.4, Dec, p.331-40. 1994.

Martins, V. R., E. Graner, *et al.* Complementary hydropathy identifies a cellular prion protein receptor. Nat Med, v.3, n.12, Dec, p.1376-82. 1997.

Martins, V. R., R. Linden, *et al.* Cellular prion protein: on the road for functions. FEBS Lett, v.512, n.1-3, Feb 13, p.25-8. 2002.

Mathews, T. A., B. R. Brookshire, *et al.* Ethanol-induced hyperactivity is associated with hypodopaminergia in the 22-TNJ ENU-mutated mouse. Alcohol, v.43, n.6, Sep, p.421-31. 2009.

Maurice, T., B. P. Lockhart, *et al.* Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. Brain Res, v.706, n.2, Jan 15, p.181-93. 1996.

Medeiros, R., R. D. Prediger, *et al.* Connecting TNF-alpha signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein. J Neurosci, v.27, n.20, May 16, p.5394-404. 2007.

Meggio, F., A. Negro, *et al.* Bovine prion protein as a modulator of protein kinase CK2. Biochem J, v.352 Pt 1, Nov 15, p.191-6. 2000.

Meil, W. M., J. M. Roll, *et al.* Tolerance-like attenuation to contingent and noncontingent cocaine-induced elevation of extracellular dopamine in the ventral striatum following 7 days of withdrawal from chronic treatment. Psychopharmacology (Berl), v.118, n.3, Apr, p.338-46. 1995.

Meldrum, B. Pharmacology of GABA. Clin Neuropharmacol, v.5, n.3, p.293-316. 1982.

_____. Classification of GABA and benzodiazepine receptors. J Psychopharmacol, v.1, n.1, Jan, p.1-5. 1987.

Melis, M., M. Diana, *et al.* Ethanol and acetaldehyde action on central dopamine systems: mechanisms, modulation, and relationship to stress. Alcohol, v.43, n.7, Nov, p.531-9. 2009.

Mereu, G., M. Collu, *et al.* SCH 23390, a selective dopamine D1 antagonist, activates dopamine neurons but fails to prevent their inhibition by apomorphine. Eur J Pharmacol, v.111, n.3, May 20, p.393-6. 1985.

Meyer, R. K., M. P. McKinley, *et al.* Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. Proc Natl Acad Sci U S A, v.83, n.8, Apr, p.2310-4. 1986.

Mironov, A., Jr., D. Latawiec, *et al.* Cytosolic prion protein in neurons. J Neurosci, v.23, n.18, Aug 6, p.7183-93. 2003.

Mishra, D. e K. Chergui. Ethanol inhibits excitatory neurotransmission in the nucleus accumbens of adolescent mice through GABA(A) and GABA(B) receptors. Addict Biol, Jul 25.

_____. Ethanol inhibits excitatory neurotransmission in the nucleus accumbens of adolescent mice through GABA(A) and GABA(B) receptors. Addict Biol, Jul 25. 2011.

Miyazono, M., T. Kitamoto, *et al.* Colocalization of prion protein and beta protein in the same amyloid plaques in patients with Gerstmann-Straussler syndrome. Acta Neuropathol, v.83, n.4, p.333-9. 1992.

Mizuno, K., K. Kurokawa, *et al.* Activation of GABA(A) receptors suppresses ethanol-induced upregulation of type 1 IP(3) receptors. Synapse, Sep 26. 2012.

Molleman, A. e H. J. Little. Increases in non-N-methyl-D-aspartate glutamatergic transmission, but no change in gamma-aminobutyric acidB transmission, in CA1 neurons during withdrawal from in vivo chronic ethanol treatment. J Pharmacol Exp Ther, v.274, n.3, Sep, p.1035-41. 1995.

Moonat, S., B. G. Starkman, *et al.* Neuroscience of alcoholism: molecular and cellular mechanisms. Cell Mol Life Sci, v.67, n.1, Jan, p.73-88. 2009.

Moore, N. A. e M. S. Axton. Production of climbing behaviour in mice requires both D1 and D2 receptor activation. Psychopharmacology (Berl), v.94, n.2, p.263-6. 1988.

Nazor, K. E., T. Seward, *et al.* Motor behavioral and neuropathological deficits in mice deficient for normal prion protein expression. Biochim Biophys Acta, v.1772, n.6, Jun, p.645-53. 2007.

Nestler, E. J. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. Nat Rev Neurosci, v.2, n.2, Feb, p.119-28. 2001.

- Nevo, I. e M. Hamon. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism. Neurochem Int, v.26, n.4, Apr, p.305-36; discussion 337-42. 1995.
- Novak, P., M. Prcina, *et al.* Tauons and prions: infamous cousins? J Alzheimers Dis, v.26, n.3, 2011, p.413-30. 2011.
- Oesch, B., D. Westaway, *et al.* A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. Cell, v.40, n.4, Apr, p.735-46. 1985.
- Okamoto, T., M. T. Harnett, *et al.* Hyperpolarization-activated cation current (I_h) is an ethanol target in midbrain dopamine neurons of mice. J Neurophysiol, v.95, n.2, Feb, p.619-26. 2006.
- Paxinos, G. e K. B. Franklin. The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press. 2001
- Petit-Paitel, A., B. Menard, *et al.* Prion protein is a key determinant of alcohol sensitivity through the modulation of N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) activity. PLoS One, v.7, n.4, p.e34691. 2012.
- Philibin, S. D., A. Hernandez, *et al.* Striatal signal transduction and drug addiction. Front Neuroanat, v.5, p.60. 2011.
- Pickens, R. e W. C. Harris. Self-administration of d-amphetamine by rats. Psychopharmacologia, v.12, n.2, p.158-63. 1968.
- Poklis, A. e M. A. Mackell. Evaluation of a modified alcohol dehydrogenase assay for the determination of ethanol in blood. Clin Chem, v.28, n.10, Oct, p.2125-7. 1982.
- Popp, R. L., R. Lickteig, *et al.* Ethanol sensitivity and subunit composition of NMDA receptors in cultured striatal neurons. Neuropharmacology, v.37, n.1, p.45-56. 1998.
- Protais, P., J. Costentin, *et al.* Climbing behavior induced by apomorphine in mice: a simple test for the study of dopamine receptors in striatum. Psychopharmacology (Berl), v.50, n.1, Oct 20, p.1-6. 1976.
- Prusiner, S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science, v.216, n.4542, Apr 9, p.136-44. 1982a.
- _____. Research on scrapie. Lancet, v.2, n.8296, Aug 28, p.494-5. 1982b.

_____. Molecular biology of prion diseases. Science, v.252, n.5012, Jun 14, p.1515-22. 1991.

_____. Prions. Proc Natl Acad Sci U S A, v.95, n.23, Nov 10, p.13363-83. 1998.

Prusiner, S. B., D. C. Bolton, *et al.* Further purification and characterization of scrapie prions. Biochemistry, v.21, n.26, Dec 21, p.6942-50. 1982.

Prusiner, S. B. e S. J. Dearmond. Molecular biology and pathology of scrapie and the prion diseases of humans. Brain Pathol, v.1, n.4, Jul, p.297-310. 1991.

Prusiner, S. B., D. E. Garfin, *et al.* Experimental scrapie in the mouse: electrophoretic and sedimentation properties of the partially purified agent. J Neurochem, v.35, n.3, Sep, p.574-82. 1980.

Prusiner, S. B., D. F. Groth, *et al.* Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. Cell, v.38, n.1, Aug, p.127-34. 1984.

Prusiner, S. B., M. P. McKinley, *et al.* Scrapie agent contains a hydrophobic protein. Proc Natl Acad Sci U S A, v.78, n.11, Nov, p.6675-9. 1981.

Rachidi, W., D. Vilette, *et al.* Expression of prion protein increases cellular copper binding and antioxidant enzyme activities but not copper delivery. J Biol Chem, v.278, n.11, Mar 14, p.9064-72. 2003.

Rassnick, S., L. Pulvirenti, *et al.* Oral ethanol self-administration in rats is reduced by the administration of dopamine and glutamate receptor antagonists into the nucleus accumbens. Psychopharmacology (Berl), v.109, n.1-2, p.92-8. 1992.

Rial, D., F. S. Duarte, *et al.* Cellular prion protein modulates age-related behavioral and neurochemical alterations in mice. Neuroscience, Sep 8. 2009.

Rial, D., T. C. Piermartiri, *et al.* Overexpression of cellular prion protein (PrP(C)) prevents cognitive dysfunction and apoptotic neuronal cell death induced by amyloid-beta (A β (1)(-)(4)(0)) administration in mice. Neuroscience, v.215, Jul 26, p.79-89. 2012.

Rial, D., R. N. Takahashi, *et al.* Aniracetam and DNQX affect the acquisition of rapid tolerance to ethanol in mice. Pharmacol Biochem Behav, v.92, n.1, Mar, p.32-8. 2009.

Roberts, D. C. e G. F. Koob. Disruption of cocaine self-administration following 6-hydroxydopamine lesions of the ventral tegmental area in rats. Pharmacol Biochem Behav, v.17, n.5, Nov, p.901-4. 1982.

Roberts, D. C., G. F. Koob, *et al.* Extinction and recovery of cocaine self-administration following 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens. Pharmacol Biochem Behav, v.12, n.5, May, p.781-7. 1980.

Roffe, M., F. H. Beraldo, *et al.* Prion protein interaction with stress-inducible protein 1 enhances neuronal protein synthesis via mTOR. Proc Natl Acad Sci U S A, v.107, n.29, Jul 20, p.13147-52. 2010.

Sales, N., R. Hassig, *et al.* Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons. Eur J Neurosci, v.15, n.7, Apr, p.1163-77. 2002.

Savelieva, K. V., W. M. Caudle, *et al.* Decreased ethanol preference and consumption in dopamine transporter female knock-out mice. Alcohol Clin Exp Res, v.26, n.6, Jun, p.758-64. 2002.

Schenk, S., A. Valadez, *et al.* Blockade of the acquisition of cocaine self-administration by the NMDA antagonist MK-801 (dizocilpine). Behav Pharmacol, v.4, n.6, Dec, p.652-659. 1993.

Schmitt-Ulms, G., G. Legname, *et al.* Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. J Mol Biol, v.314, n.5, Dec 14, p.1209-25. 2001.

Schuckit, M. A. Low level of response to alcohol as a predictor of future alcoholism. Am J Psychiatry, v.151, n.2, Feb, p.184-9. 1994.

Schwarze-Eicker, K., K. Keyvani, *et al.* Prion protein (PrPc) promotes beta-amyloid plaque formation. Neurobiol Aging, v.26, n.8, Aug-Sep, p.1177-82. 2005.

Sigurdsson, B. e P. A. Palsson. Visna of sheep; a slow, demyelinating infection. Br J Exp Pathol, v.39, n.5, Oct, p.519-28. 1958.

Spudich, A., R. Frigg, *et al.* Aggravation of ischemic brain injury by prion protein deficiency: role of ERK-1/-2 and STAT-1. Neurobiol Dis, v.20, n.2, Nov, p.442-9. 2005.

Steele, A. D., J. G. Emsley, *et al.* Prion protein (PrPc) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.9, Feb 28, p.3416-21. 2006.

Stoof, J. C. e J. W. Kebabian. Opposing roles for D-1 and D-2 dopamine receptors in efflux of cyclic AMP from rat neostriatum. Nature, v.294, n.5839, Nov 26, p.366-8. 1981.

Surmeier, D. J., W. J. Song, *et al.* Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. J Neurosci, v.16, n.20, Oct 15, p.6579-91. 1996.

Svenningsson, P., A. C. Nairn, *et al.* DARPP-32 mediates the actions of multiple drugs of abuse. AAPS J, v.7, n.2, p.E353-60. 2005.

Tobler, I., S. E. Gaus, *et al.* Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. Nature, v.380, n.6575, Apr 18, p.639-42. 1996.

Tritsch, N. X. e B. L. Sabatini. Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. Neuron, v.76, n.1, Oct 4, p.33-50. 2012.

Turk, E., D. B. Teplow, *et al.* Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. Eur J Biochem, v.176, n.1, Sep 1, p.21-30. 1988.

Tzschenke, T. M. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. Addict Biol, v.12, n.3-4, Sep, p.227-462. 2007.

Van Vliet, L. A., P. G. Tepper, *et al.* Affinity for dopamine D2, D3, and D4 receptors of 2-aminotetralins. Relevance of D2 agonist binding for determination of receptor subtype selectivity. J Med Chem, v.39, n.21, Oct 11, p.4233-7. 1996.

Vasconcelos, S. M., D. S. Macedo, *et al.* Effect of one-week ethanol treatment on monoamine levels and dopaminergic receptors in rat striatum. Braz J Med Biol Res, v.36, n.4, Apr, p.503-9. 2003.

Vasse, M., A. Chagraoui, *et al.* Climbing and stereotyped behaviours in mice require the stimulation of D-1 dopamine receptors. Eur J Pharmacol, v.148, n.2, Mar 29, p.221-9. 1988.

Volkow, N. D. What do we know about drug addiction? Am J Psychiatry, v.162, n.8, Aug, p.1401-2. 2005.

Volkow, N. D., J. S. Fowler, *et al.* The addicted human brain: insights from imaging studies. J Clin Invest, v.111, n.10, May, p.1444-51. 2003.

_____. Reproducibility of repeated measures of carbon-11-raclopride binding in the human brain. J Nucl Med, v.34, n.4, Apr, p.609-13. 1993.

Volpicelli, J. R., A. I. Alterman, *et al.* Naltrexone in the treatment of alcohol dependence. Arch Gen Psychiatry, v.49, n.11, Nov, p.876-80. 1992.

Wang, V., T. C. Chuang, *et al.* Octarepeat changes of prion protein in Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord, May 1. 2008.

Warner, R. G., C. Hundt, *et al.* Identification of the heparan sulfate binding sites in the cellular prion protein. J Biol Chem, v.277, n.21, May 24, p.18421-30. 2002.

Weight, F. F., D. M. Lovinger, *et al.* Alcohol inhibition of NMDA channel function. Alcohol Alcohol Suppl, v.1, p.163-9. 1991.

Weise, J., R. Sandau, *et al.* Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury. Stroke, v.37, n.5, May, p.1296-300. 2006.

Weiss, F., Y. L. Hurd, *et al.* Neurochemical correlates of cocaine and ethanol self-administration. Ann N Y Acad Sci, v.654, Jun 28, p.220-41. 1992.

World Health Organization (WHO). Global status report on alcohol and health. WHO report. 2011.

Wilson, D. L. Protein synthesis and nerve cell specificity. J Neurochem, v.22, n.3, Mar, p.465-7. 1974.

Wilson, D. R., R. D. Anderson, *et al.* Studies in scrapie. J Comp Pathol, v.60, n.4, Oct, p.267-82. 1950.

Wise, R. A., P. Newton, *et al.* Fluctuations in nucleus accumbens dopamine concentration during intravenous cocaine self-administration in rats. Psychopharmacology (Berl), v.120, n.1, Jul, p.10-20. 1995.

Woolverton, W. L. Effects of a D1 and a D2 dopamine antagonist on the self-administration of cocaine and piribedil by rhesus monkeys. Pharmacol Biochem Behav, v.24, n.3, Mar, p.531-5. 1986.

Xikota, J. C., D. Rial, *et al.* Mild cognitive deficits associated to neocortical microgyria in mice with genetic deletion of cellular prion protein. Brain Res, Sep 24. 2008.

Yim, H. J., T. Schallert, *et al.* Comparison of local and systemic ethanol effects on extracellular dopamine concentration in rat nucleus accumbens by microdialysis. Alcohol Clin Exp Res, v.22, n.2, Apr, p.367-74. 1998.

Yin, H. H., B. S. Park, *et al.* Ethanol reverses the direction of long-term synaptic plasticity in the dorsomedial striatum. Eur J Neurosci, v.25, n.11, Jun, p.3226-32. 2007.

Yokel, R. A. e R. A. Wise. Increased lever pressing for amphetamine after pimozide in rats: implications for a dopamine theory of reward. Science, v.187, n.4176, Feb 14, p.547-9. 1975.

Zanata, S. M., M. H. Lopes, *et al.* Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. Embo J, v.21, n.13, Jul 1, p.3307-16. 2002.

Apêndice

Artigo referente à tese:

Manuscrito finalizado: Cellular prion protein (PrP^C) and dopamine interactions modulate ethanol addictive properties in mice. Submetido ao *The Journal of Neuroscience*.

Outros artigos:

1. Rial, D., Piermartiri, T.C., Duarte, F.S., Tasca, C.I., Walz, R., Prediger, R.D.

Overexpression of cellular prion protein (PrP^C) prevents cognitive dysfunction and apoptotic neuronal cell death induced by amyloid- β (A β 1 ζ 40) administration in mice. *Neuroscience.* , v.215, p.79 - 89, 2012.

2. Machado, Daniele G., Cunha, Mauricio P., Neis, Vivian B., Balen, Grasiela O., Colla, André R., Grando, Jaíne, Brocardo, Patricia S., Bettio, Luis E.B., Dalmarco, Juliana B., Rial, Daniel, Prediger, Rui D., Pizzolatti, Moacir G., Rodrigues, Ana Lúcia S.

Rosmarinus officinalis L. hydroalcoholic extract, similar to fluoxetine, reverses depressive-like behavior without altering learning deficit in olfactory bulbectomized mice. *Journal of Ethnopharmacology.* , v.11, p.22 - , 2012.

3. Piermartiri, Tetsadê C.B., Figueiredo, Cláudia P., Rial, Daniel, Duarte, Filipe S., Bezerra, Sarah C., Mancini, Gianni, de Bem, Andreza F., Prediger, Rui D.S., Tasca, Carla I.

Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and

oxidative stress following amyloid- β 1-40 administration in mice: Evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage. *Experimental Neurology*. , p.345 - 357, 2010.

4. Moreira, Eduardo L.G., Rial, Daniel, Duarte, Filipe S., De Carvalho, Cristiane Ribeiro, Horst, Heros, Pizzolatti, Moacir G., Prediger, Rui D.S., Ribeiro-do-Valle, Rosa Maria

Central nervous system activity of the proanthocyanidin-rich fraction obtained from *Croton celtidifolius* in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. , v.62, p.1061 - 1068, 2010.

5. Schwarzbold, M, Rial, D., De Bem, T., Guilhermano, D., Cunha, M.P., dos Santos, A.A., dos Santos, D.B, Figueiredo, Cláudia P., Farina, M., Goldfeder, E.M., Rodrigues, A.L.S., Prediger, R. D., Walz, R.

Effects of traumatic brain injury of different severity on emotional, cognitive and oxidative stress-related parameters in mice. *Journal of Neurotrauma*. , v.1, p.3 - 13, 2010.

6. Aguiar-Jr, Aderbal S., Boemer, George, Rial, Daniel, Cordova, Fabiano M., Mancini, Gianni, Walz, Roger, de Bem, Andreza F., Latini, Alexandra, Leal, Rodrigo B., Pinho, Ricardo A.

High-intensity physical exercise disrupts implicit memory in mice:

involvement of the striatal glutathione antioxidant system and intracellular signaling. *Neuroscience*. , p.4 - 7, 2010.

7. Moreira, Eduardo L. G., Rial, Daniel, Aguiar, Aderbal S., Figueiredo, Cláudia P., Siqueira, Jarbas M., DalBó, Silvia, Horst, Heros, Oliveira, Jade, Mancini, Gianni, dos Santos, Tiago S., Villarinho, Jardel G., Pinheiro, Francielle V., Marino-Neto, José, Ferreira, Juliano, Bem, Andreza F., Latini, Alexandra, Pizzolatti, Moacir G., Ribeiro-do-Valle, Rosa M., Prediger, Rui D. S.

Proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* Baill confers neuroprotection in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine rat model of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*. , p.4 - 14, 2010.

Outras apresentações no período do doutoramento:

1. Silva, H., Rial, D., Valadas, J., Tomé, A, Lopes, L, Da Cunha, R.

Tonic activation of A2A receptors control synaptic plasticity at hippocampal and striatal glutamatergic synapses In: FENS - Federation of European Neuroscience Societies, 2012, Barcelona. **FENS**. Barcelona: FENS, 2012. v.1. p.2 - 2

2. Rial, D., Schmitz ,A.R, Piermartiri, T.C.B., Tasca, C.I., Walz, R., Dafré,

Alcir L., Prediger, R. D. Overexpression of cellular prion protein (PrPC) in transgenic mice modulates the neurotoxic effects of Abeta 1-40 In: Society for Neuroscience annual meeting, 2011, Washington D.C. **Society for Neuroscience annual meeting**. New York: SfN, 2011. v.1. p.15 - 15

3. Rial, D., Pandolfo, P., Pamplona, F. A., Bitencourt, R.M., Moreira, E.L.G., Moreira, K.M., Da Cunha, C., Dombrowski, P., Hipolide, D., Takahashi, R. N., Martins, V., Walz, R., Prediger, R. D. Plasticity of the dopaminergic mesocorticolimbic pathway underlies the increased resistance to ethanol addictive properties in cellular prion protein null mice.. In: LASBRA (Latin American Society for Biomedical Research on Alcoholism) Meeting 2011, 2011, São Paulo. **LASBRA 2011**. São Paulo: LASBRA, 2011. v.11. p.111 - 1

4. Rodrigues, D., Rial, D., Cunha, A.R., Agostinho, P.M, Prediger, R. D. Prion protein is located in striatal dopaminergic neurons and nerve terminals In: Congresso da Sociedade Portuguesa de Neurociência, 2011, Lisboa. **Congresso da Sociedade Portuguesa de Neurociência**. Lisboa: SPN, 2011. v.1. p.31 - 31

5. Rial, D., Pandolfo, P., Bitencourt, R.M., Pamplona, F. A., Dombrowski, P., Da Cunha, C., Hipolide, D., Moreira, K.M., Moreira, E.L.G., Takahashi,

R. N., Martins, V., Walz, R., Prediger, R. D. Plasticity of the dopaminergic mesocorticolimbic pathway underlies the increased resistance to ethanol addictive properties in cellular prion protein null-mice In: NIDA mini convention: Frontiers in addiction research, 2010, San Diego, CA. **NIDA mini convention: Frontiers in addiction research**. New York: NIDA, 2010. v.1. p.53 - 53

6. Rial, D., Pandolfo, P., Bitencourt, R.M., Pamplona, F. A., Dombrowski, P., Da Cunha, C., Hipolide, D., Moreira, K.M., Moreira, E.L.G., Takahashi, R. N., Martins, V., Walz, R., Prediger, R. D.

Plasticity of the dopaminergic mesocorticolimbic pathway underlies the increased resistance to ethanol addictive properties in cellular prion protein null-mice In: NIDA mini convention: Frontiers in addiction research, 2010, San Diego, CA. **Society for Neuroscience annual Meeting**. San Diego (CA, USA) 2010. v.1. p.53 - 53

7. Tasca, C.I., Piermartiri, T.C.B., Figueiredo, C.P., Bezerra, S.C., Rial, D., Duarte, F.S., Mancini, G., De Bem, A.F., Prediger, R. D. Atorvastatin prevents hippocampal cell degeneration, neuroinflammation and oxidative stress following amyloid-beta-1-40 administration in mice In: XXXIV

Congresso anual da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento - SBNeC, 2010, Caxambu. **Caderno de Resumos - SBNeC**. São Paulo: SBNeC, 2010. v.1. p.35 –

8. Wopereis, S., Rial, D., Moreira, E.L.G., Prediger, R. D. Caffeine prevents cognitive and motor impairments in the intranasal MPTP rat model of Parkinson's disease In: XXXIV Congresso anual da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento - SBNeC, 2010, Caxambu. **Caderno de Resumos - SBNeC**. São Paulo: SBNeC, 2010. v.1. p.28 - 28

9. Aguiar Jr., A.S., Boemer, G., Rial, D., Matheus, F.C., Glaser, V., Latini, A., Da Cunha, C., Prediger, R. D.

Efeitos neuroprotetores do exercício físico em camundongos submetidos a modelos experimentais da doença de Parkinson através da administração das neurotoxinas 6-Hidroxidopamina e 1-Metil-4-Fenil-1,2,3,6-Tetraidropiridina In: III Congresso Brasileiro de Metabolismo, nutrição e exercício, 2010, Londrina. **III Congresso Brasileiro de Metabolismo, nutrição e exercício**. Londrina: III Congresso Brasileiro de Metabolismo, nutrição e exercício, 2010. v.1. p.2 -

10. Oliveira, K.G., Martins, R.P, Mancini, G., Oliveira, J., Glaser, V., Matos, F.J., Castro, A.A., Prediger, R. D., Rial, D., Latini, A. In vivo effect

of neopterin on behavioral and neurochemical parameters In: Sociedade Brasileira de bioquímica e biologia molecular, 2010, Foz do Iguaçu.

XXXIX Annual meeting of SBBq. São Paulo: SBBq, 2010. v.1. p.44 - 44

11. Boemer, G., Aguiar Jr., A.S., Rial, D., Córdova, F., Mancini, G., de Bem, Andreza F., Latini, A., Leal, R.B., Prediger, R. D.O exercício físico de alta intensidade induz disfunção de memória implícita em camundongos - Papel da glutathione redutase e da sinalização ERK 1/2, CREB DARPP-32 no estriado In: III Congresso Brasileiro de Metabolismo, nutrição e exercício, 2010, Londrina.

III Congresso Brasileiro de Metabolismo, nutrição e exercício.

Londrina: III Congresso Brasileiro de Metabolismo, nutrição e exercício, 2010. v.1. p.2 – 2

12. Aguiar Jr., A.S., Boemer, G., Rial, D., Matheus, F.C., Moreira, E.L.G., Da Cunha, C., Prediger, R. D. Physical exercise reduces motor alterations associated to dopamine receptors imbalance in neurotoxicant models of Parkinson's disease In: 42 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2010, Ribeirão Preto. **42 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental.** São Paulo: SBFTE, 2010. v.1. p.17 - 17

13. Rial, D., Pandolfo, P., Bitencourt, R.M., Pamplona, F. A., Dombrowski, P., Da Cunha, C., Hipolide, D., Moreira, K.M., Moreira, E.L.G., Takahashi, R. N., Martins, V., Walz, R., Prediger, R. D.

Plasticity of the dopaminergic mesocorticolimbic pathway underlies the increased resistance to ethanol addictive properties in cellular prion protein null-mice In: XXXIV Congresso anual da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento - SBNeC, 2010, Caxambu. **Caderno de Resumos - SBNeC**. São Paulo: SBNeC, 2010. v.1. p.28 - 28

14. Matheus, F.C., Rial, D., Aguiar Jr., A.S., Santos, A.R.S, Prediger, R. D. Agmatine prevents social recognition memory impairments in mice submitted to intranasal MPTP model of Parkinson's disease In: 41 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2009, Ribeirão Preto. **41 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**. , 2009. v.1. p.27 – 27